

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Purificación parcial y caracterización bioquímica de  
un factor de difusión del veneno de la serpiente  
peruana *Bothrops atrox* (Jergón)**

**TESIS**

**para optar al grado académico de Bachiller en Ciencias Biológicas**

**AUTOR:**

**Edgar Ernesto González Kozlova**

**ASESOR :**

**Armando Yarlequé Chocas**

**Lima – Perú**

**2011**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que siempre me respaldaron, aconsejaron y permitieron escoger la carrera de mi interés sin presionarme.

A los profesores en general por los conocimientos y experiencias compartidas durante mi formación Académica.

Al Doctor Armando Yarlequé, jefe del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM por su constante apoyo, asesoramiento y por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis.

A la profesora Fanny Lazo y al profesor Ruperto Severino, por haberme encaminado a ser una persona más ordenada y disciplinada, por apoyarme durante mi formación académica, dentro y fuera de los salones de clase.

Al profesor Orestes Málaga, por enseñarme lo que significa tener vocación por la ciencia, además de todas sus sugerencias, comentarios y bromas.

A la profesora Edith Rodríguez, por los buenos consejos y su interés en el avance de esta tesis.

Al Biólogo Gustavo Sandoval, por compartir sus conocimientos y por las interesantes discusiones que me enseñaron a nunca satisfacer una pregunta con una sola respuesta.

A los Biólogos Julio Mendoza, Rosio Inga, Dan Vivas, Nora Ruiz y Susan Medina por enseñarme a trabajar en equipo además de enseñarme que los pequeños detalles son muy importantes para obtener buenos resultados.

A mis amigos y colegas, Frank Huari, Nataly Allasi y Cesar Ortiz, con los que trabajé codo a codo.

## INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

ANTECEDENTES 4

MATERIALES Y MÉTODOS 8

RESULTADOS 17

DISCUSIÓN 21

CONCLUSIONES 30

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31

TABLAS Y FIGURAS 45

## ABREVIATURAS

AH	: Acido Hialurónico
HA-Ba	: Hialuronidasa de <i>Bothrops atrox</i>
PMSF	: Fluoruro de metil sulfonilo
TLCK	: Tosil lisil Clorometil cetona
2-Me	: 2-Mercapto etanol
SDS	: DodecilSulfato Sódico
PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida
UDF	: Unidad Di Ferrante
UTA	: Unidades Totales de Actividad
FTXS	: Toxinas de tres dedos
CRISPS	: Proteínas ricas en residuos de cisteína
mg	: Miligramos
µg	: Microgramos
mL	: Mililitros
µL	: Microlitros

## RESUMEN

Se aisló parcialmente una hialuronidasa del veneno de *Bothrops atrox* mediante dos pasos cromatograficos sobre DEAE Sephadex A-50 y Sephadex G-50, utilizando en ambos casos acetato de amonio 0,05M y pH 5,0. La enzima fue purificada 145 veces con un rendimiento de 72 % y por PAGE-SDS se obtuvo una banda proteica con un peso molecular de 110 kDa en condiciones reductoras y no reductoras. Se determinó la estabilidad de la actividad de esta enzima en distintos valores de pH en el tiempo, así como la neutralización de sueros anti-ofídicos de tipo IgG e IgY producidos en el Instituto Nacional de Salud-Perú y en el Laboratorio de Biología Molecular – UNMSM respectivamente. La enzima revelo ser sensible a la temperatura, con un pH óptimo de 6,0 y encontrarse en cantidades bajas en el veneno. La actividad enzimática fue inhibida en mayor proporción por sueros anti-lachesicos que por sueros anti-botropicos, ensayos “*in vitro*” mostraron que incrementa la difusión del veneno en 50 %. Es inhibida totalmente por suero humano y dexametasona mientras que los ensayos con inhibidores demostraron que los residuos de Tyr y Cys son importantes para la actividad de esta enzima.

**Palabras clave:** Veneno, serpiente, *Bothrops atrox*, hialuronidasa, glicano hidrolasa.

## ABSTRACT

A hialuronidase was partially isolated from the venom of *Bothrops atrox* using DEAE Sephadex A-50 and Sephadex G-50, in both cases using ammonium acetate 0,05M pH 5,0 as buffer. The enzyme was purified with 145 fold, a yield of 72 % and a molecular weight of 110 kDa with and without 2-Mercaptoetanol by PAGE-SDS. The stability of the hialuronidase activity from the venom of the snake *Bothrops atrox* was defined at different pH values, as well the effect of anti-snakes serums of the IgG and IgY types produced by the National Institute of Health - Perú and the Laboratory of Molecular Biology-UNMSM respectively using the turbidimetric test Di Ferrante. This enzyme elucidate been sensitive to the temperature, optimum pH 6,0 and found at very low concentrations in the venom. The enzyme activity was inhibited in more proportion by the anti-lachesis-serums rather than anti-botropics-serums, also show to increase the venom diffusion in 50 %, besides of been inhibited totally by human-serum and dexametasona while the inhibitors assays showed that Tyr and Cys are important to the active site.

**Key words:** Venom, snake, *Bothrops atrox*, hialuronidase, glycano hidrolase.

## INTRODUCCIÓN

El veneno es un conjunto de moléculas que ha evolucionado en distintos Phyla de animales y plantas, para alterar la homeostasis de un organismo con fines de defensa y/o alimentación. En serpientes, el veneno es una herramienta en constante cambio que subraya la evolución de estos animales. A pesar de esto, se sabe muy poco sobre la diversificación en la composición proteica del veneno (*Fry et al.*, 2008).

En el Perú, la serpiente *Bothrops atrox* “Jergón” es la responsable de la mayor cantidad de accidentes ofídicos reportados (Zavaleta y Chang, 1987). La creciente urbanización hacia las regiones donde habita este animal, sumado a la marcada agresividad de esta especie explicaría la frecuencia con la que se producen estos accidentes (Zavaleta, 2004).

El envenenamiento causado por *Bothrops atrox* induce un complejo cuadro de alteraciones fisiopatológicas locales y sistémicas, tales como dolor, edema, hemorragia, coagulopatías, mionecrosis, dermonecrosis, choque cardiovascular y nefrotoxicidad resultado de la actividad proteolítica y hemolítica del veneno (Rosenfeld, 1971). Estos síntomas son causados por el coctel de moléculas tóxicas presentes en el veneno, cuyo poder destructivo se ve incrementado gracias a su rápida difusión en los tejidos cercanos al lugar de la mordedura por acción de la enzima conocida como hialuronidasa o “factor de dispersión” (Tu y Hendon, 1983, Watson 1993, Girish *et al.*, 2004b). Estas enzimas poseen una actividad marcada sobre el ácido hialurónico (AH) (Kreil, 1995) que funciona como el pegamento de los tejidos, que al ser destruido facilita la dispersión del veneno e inclusive incrementa la potencia de otras enzimas como las fosfolipasas del tipo A<sub>2</sub> (Girish y Kemparaju, 2007).

El AH es un polisacárido multifuncional de alto peso molecular encontrado en todo el reino animal, especialmente en la matriz extracelular de tejido conectivo blando (Menzel y Farr, 1998), participa en muchos procesos biológicos como la fecundación, reproducción, envejecimiento, comunicación celular e incluso en la formación de tumores (Jhonston y Mixner, 1950 y Stern, 2008).

La información sobre hialuronidasas presentes en venenos ofídicos era escasa a fines del siglo pasado a pesar de su importancia en muchos procesos biológicos (Watson, 1993). Actualmente existe una gran controversia respecto al origen de estas enzimas por lo que se estudia su presencia en diversos grupos de animales desde invertebrados hasta mamíferos, sin mencionar el latente potencial farmacológico que presentan. Entre los retos que enfrenta el trabajo con este grupo de enzimas se encuentra su limitada presencia en venenos de ofidios, la pobre estabilidad frente a la temperatura y en el tiempo, además de los continuos debates sobre la efectividad de los métodos existentes para cuantificar la actividad de estas enzimas (El-Safory *et al.*, 2010).

La presente investigación estudia la enzima hialuronidasa perteneciente a la serpiente *B. atrox*, especie de importancia en salud pública en el país, recalcando que existiendo una enorme diversidad de vipéridos en América del Sur solo el veneno de unas cuantas ha sido estudiado y en menor proporción las hialuronidasas. Se reporta la actividad hialuronidasa en trabajos de Yarlequé (2000) en diferentes venenos y es posible encontrar una caracterización parcial de la hialuronidasa presente en el veneno de *Lachesis muta muta* (Lerma 2006, Hurtado *et al.*, 2007) por lo que se espera aportar información valiosa al estudio de los venenos ofídicos del continente, al diseño de mejores antivenenos y al desarrollo de nuevas drogas (Koh *et al.*, 2006, Yarlequé *et al.*, 2008).



Es de interés el desarrollo de sueros antiofídicos que puedan neutralizar los efectos tóxicos de los ofidios, artrópodos y moluscos venenosos (Pessini *et al.*, 2001; Yarleque, 2000; Pavattan *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2009), con el avance de la tecnología el diseño de mejores sueros capaces de neutralizar los venenos y salvar la vida humana han mejorado pero se ha rezagado la neutralización de los daños locales cercanos a la mordedura causados por las hialuronidasas resultando muchas veces en un costo adicional para los pacientes en cirugías reconstructivas (Yingprasertchai *et al.*, 2003; Girish *et al.*, 2002).

El objetivo del presente trabajo fue purificar y caracterizar bioquímicamente la hialuronidasa de *Bothrops atrox* para determinar su estabilidad, efecto difusor y neutralización por antivenenos de origen equino y aviar.

## ANTECEDENTES

Las hialuronidasas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en el reino animal. En años recientes han captado mucha atención debido a su rol en el metabolismo regulatorio del ácido hialurónico y durante el envenenamiento. En 1928, Duran-Reynals investigó un factor de difusión encontrado en algunas cepas bacterianas de estreptococos. Este factor posteriormente fue identificado como una enzima con actividad sobre el ácido hialurónico y fue subsecuentemente denominada hialuronidasa (Meyer, 1971). Lisanti en 1950 reportó una hialuronidasa presente en la saliva humana, posteriormente se han encontrado estas enzimas en toda la escala zoológica (Girish y Kemparaju, 2007). El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano cargado negativamente y de alto peso molecular, encontrado principalmente en la matriz extracelular, pero también ha sido reportado en el citoplasma, núcleo y nucléolo transformándose en un polímero con una participación extraordinaria en muchos procesos metabólicos, desde la fertilización hasta el crecimiento y metástasis tumoral (Lokeshwar *et al.*, 2008), en una gran gama de organismos vivos (Stern, 2008), lo cual ha llamado la atención de la comunidad científica incrementando el número de trabajos y publicaciones en este grupo de enzimas (El-Safory *et al.*, 2010).

En 1971, Meyer demostró que existen al menos tres tipos de hialuronidasas dependiendo de su origen y dos tipos según su sitio catalítico. Las enzimas presentes en venenos de serpientes pertenecen al grupo de las hialuronato glicanohidrolasas (glicosidasas) y degradan HA a tetrasacáridos y hexasacáridos, además de actuar sobre sulfatos de condroitina (Etesse *et al.*, 2009). Estas hialuronidasas tienen un rol crítico en la degradación del AH y la eventual pérdida de integridad de la membrana extracelular de tejidos conectivos que rodean vasos sanguíneos, permitiendo la difusión de los

componentes tóxicos del veneno al sistema circulatorio, además de la difusión en los tejidos cercanos a la mordedura (Kemparaju y Girish, 2006). También representa el principal alérgeno de veneno producido por escorpiones, abejas y avispas que puede inducir serias reacciones sistémicas fatales mediadas por IgE en humanos (Morey *et al.*, 2006) lo que explica por qué funciona como un buen inmunógeno al causar títulos altos de anticuerpos y reacciones alérgicas al ser inoculado en animales de experimentación (Pavattan *et al.*, 2005; Matysiak *et al.*, 2011).

Actualmente se debate el origen de estas enzimas ya que las presentes en diferentes grupos animales comparten similitudes estructurales con las enzimas que se encuentran en espermatozoides de mamíferos (Gmachl *et al.*, 1993). Las hialuronidasas de mamíferos que se encuentran unidas a glicosil-fosfatidilinositol, se conocen como la familia PH-20 y participan en el proceso de fecundación. La estructura de estas enzimas se reportó a inicios de los 60, aisladas de testículos y espermatozoides (Johnston y Mixner, 1950, Garvin *et al.*, 1974). La caracterización de la hialuronidasa del pez piedra (*Synanceja horrida*) elucidó que estaría relacionada evolutivamente a las PH-20 como indican análisis computacionales a partir del trabajo con ADN complementario (Cheong *et al.*, 2005).

El primer estudio sobre hialuronidasa de reptiles comenzó en la década del ochenta (Tu y Hendon, 1983), después no existió ninguna caracterización enzimática detallada hasta el año 2001 donde Kudo y Tu (2001) presentaron la caracterización de la hialuronidasa de la serpiente asiática *Agkistrodon acutus acutus* usando tres pasos cromatográficos tanto de intercambio iónico como de filtración o exclusión. También se aislaron dos isoformas de hialuronidasa del veneno de la cobra procedente de la India *Naja naja* (Girish y Kemparaju, 2005a) con la particularidad de tener pesos moleculares diferentes. Se reportan hialuronidasas en los venenos de mantaraya (*Potamotrygon motoro*) (Magalhaes

*et al.*, 2008), en arañas (Silveira *et al.*, 2007) y hasta en cefalópodos así como otros moluscos (Fry *et al.*, 2009). La hialuronidasa presente en el veneno de *Apis mellifera* representa el principal componente alérgico (Markovic-Housley *et al.*, 2000) el cual fue sometido a espectrometría de masas (MALDI-TOF y nanoESI-QqTOF), donde obtuvieron resultados de la composición peptídica (Matysiak *et al.*, 2011), los cuales fueron similares a los obtenidos por métodos menos costosos como los rayos X (Markovic-Housley *et al.*, 2000) por lo que la metodología empleada en el estudio de las hialuronidasas se evalúa constantemente (Takahashi *et al.*, 2003; El-Safory *et al.*, 2010). Es posible encontrar hialuronidasas en *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Glossina fuscipes* “Mosca tse-tse” donde representan más del 20% del proteoma de las glándulas salivales (Volfova *et al.*, 2008) en contraste de las cantidades presentes en los venenos de serpientes donde se encuentran en cantidades inferiores al 1% del veneno (Girish *et al.*, 2007).

En el Perú se vienen estudiando los venenos de serpientes desde los años 70 por su importancia en casos de ofidismo, existiendo un gran número de publicaciones sobre los diferentes componentes del veneno y su efecto durante el envenenamiento (Yarlequé, 2000). La neutralización de los efectos tóxicos del veneno de serpientes del género *Bothrops* y *Lachesis* mediante sueros anti-ofídicos producidos en los Institutos Nacionales de Salud (INS) de Perú, Colombia y Brasil (Laing *et al.*, 2004) demostró su efectividad en el tratamiento del envenenamiento. Posteriormente se detalló el efecto del suero antiofídico – INS (Perú) frente a las diferentes actividades enzimáticas responsables de los efectos del veneno incluyendo fosfolipasas, L-amino oxidasas y hialuronidasas (Mendoza *et al.*, 2008).

Las hialuronidasas de serpientes no son caracterizadas bioquímicamente en América hasta el 2006, reportándose el aislamiento la enzima perteneciente al veneno de *Lachesis muta muta* empleando cromatografías de intercambio iónico y filtración molecular (Lerma, 2006 y Hurtado *et al.*, 2007) a diferencia de las hialuronidasas de serpientes africanas en las cuales se encontró un nivel alto de identidad estructural, mayor al 95%, entre las serpientes de los géneros *Bitis*, *Cerastes* y *Echis*, deducido a partir de en secuencias de ADN complementario aisladas por PCR de glándulas venenosas de estos vipéridos provenientes de Kenya, Egipto y Nigeria. (Harrison *et al.*, 2007), reflejando parte de la historia evolutiva de estas enzimas.

Las hialuronidasas de los hexápodos *Phlebotomus* y *Lutzomyia* poseen un efecto biológico que exacerba las lesiones epidérmicas causadas por *Leishmania major* (un parásito transmitido por la picadura de estos hexápodos) y aumenta el éxito de las infecciones causadas por estos parásitos (Volfova *et al.*, 2008) mientras que los efectos de estas enzimas presentes en el veneno de serpientes es el de potenciar la acción de toxinas como las causantes de hemorragias (Girish *et al.*, 2004). Otras investigaciones relacionan su participación en la comunicación y muerte celular (Prestwich *et al.*, 2011).

La visión para el futuro es poder emplear la información sobre estas enzimas para beneficio del hombre tanto en el tratamiento de enfermedades relacionadas a carbohidratos, matriz extracelular, cáncer y en su neutralización efectiva para reducir los daños locales producidos por la mordeduras de ofidios y otros animales ponzoñosos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material Biológico

1.1. **Veneno.-** Se utilizó el veneno liofilizado de la serpiente *Bothrops atrox* de ejemplares procedentes de Pucallpa, Junín, Alto Marañón, Tingo María y La Merced, mantenidos en el serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El veneno se mantuvo almacenado a -4 °C hasta su uso.

1.2. **Antivenenos.-** Se utilizaron los sueros antiofídicos al estado líquido de los siguientes tipos: anti-botrópico polivalente y anti-lachésico monovalente, producidos por el Instituto Nacional de Salud (INS) de Lima-Perú. Además se emplearon inmunoglobulinas preparadas y purificadas de gallinas contra el veneno de *Bothrops atrox* y *Lachesis muta* respectivamente en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM.

1.3. **Glóbulos rojos humanos.-** Se obtuvo a partir de sangre venosa de pacientes voluntarios en buenas condiciones de salud. Volúmenes de 10 mL de sangre fueron mezcladas con 1mL de citrato de sodio 3,8% y centrifugadas por 10 minutos a 4 000 rpm, separando el paquete celular que contiene eritrocitos. Dichos eritrocitos fueron usados para ensayos de inmunodifusión en placa.

1.4. **Suero sanguíneo humano.-** A partir de sangre venosa de pacientes voluntarios en buenas condiciones de salud se prepararon las muestras de suero humano. Para ello 10 mL de sangre en ausencia de anticoagulantes fueron colocados a 37 °C por 1 hora hasta la coagulación total de dicha muestra. Luego se centrifugó a 4 000 rpm por 10 minutos separando el sobrenadante que corresponde al suero.

## 2. Material de laboratorio

### 2.1 Reactivos

2.1.1 **Sustratos.-** Ácido hialurónico de origen bacteriano.

2.1.2 **Buffers.-** Acetato de amonio, Tris-HCl, Citrato de sodio, Buffer Fosfato, PBS y Buffer de corrida electroforética.

2.1.3 **Estándares de peso molecular.-** Se emplearon como marcadores proteínas de pesos moleculares conocidos como: albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisozima (14,3 kDa) y el marcador de peso Perfect Markers Sigma que contiene proteínas de peso de 15 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa y 225 kDa.

2.1.4 **Electroforesis.-** Acrilamida, bis acrilamida, tetra etil metilen diamina (TEMED), persulfato de amonio, azul brillante de Coomassie, azul de bromofenol y sodio dodecil sulfato (SDS).

2.1.5 **Cromatografía.-** Para el fraccionamiento del veneno de *Bothrops atrox* se emplearon columnas cromatográficas de intercambio iónico y filtración

molecular tales como DEAE Sephadex A-50 y Sephadex G-50 respectivamente.

2.1.6 **Agentes modificadores de la actividad enzimática.-** Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF), Iodoacetato, Tosyl Lisil Clorometil Cetona (TLCK), 2-Mercaptoetanol (2-ME), Dexametasona.

2.1.7 **Otros.-** Glicina, glicerol, ácido tricloroacético, azida de sodio, agarosa 1,5% y emulsión lipoproteica de yema de huevo al 3%.

## 2.2 Material de vidrio

- Probetas graduadas de 10, 100, 250, 500 mL y 1 L.
- Fiolas de 50, 100, 200 y 250 mL
- Tubos de ensayo (13x100 cm)
- Pipetas de vidrio y automáticas graduadas de 25 uL, 50 uL, 100 uL, 200 uL, 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL.
- Placas Petri.

## 2.3 Equipos

- Balanza analítica, Ainsworth.
- Baño de temperatura regulable, Memmert.
- Equipo de electroforesis en placa vertical, Sigma Techware.
- Espectrofotómetro UV, Shimadzu.
- Fotocolorímetro, Spectronic Bausch & Lomb.
- Fuente de poder para electroforesis, Duostat Beckman.



### **3. Métodos**

#### **3.1 Cuantificación de proteínas**

La cantidad de proteína de las muestras fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm (Warburg y Christian, 1941) para un monitoreo rápido durante las cromatografías y posteriormente por el método de Lowry *et al.*, (1951) modificado en este laboratorio (Loayza *et al.* 1985), empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

#### **3.2 Determinación de la actividad enzimática**

La actividad hialuronidasa se determinó por el método turbidimétrico de Di-Ferrante, (1955). El cual se consiste en la interacción entre el ácido hialurónico y el BCTA (Bromuro Cetil Trimetil Amonio). Para esta prueba se utilizó 0,4 mL de ácido hialurónico a una concentración de 0,25 mg/mL diluído en buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0 con NaCl 0,15 M. Se adicionó 0,1 mL de muestra (veneno de *B. atrox* ó enzima) e inmediatamente se incubó a 37 °C en baño maría por 15 minutos. La reacción fue detenida con 2 mL de BCTA al 2,5% en NaOH 2%, midiéndose la absorbancia a 400 nm con un volumen final en cada tubo de ensayo de 2,5 mL. Empleando este método, se cuantificó la actividad de 12 muestras de veneno de *B. atrox*, seleccionando una muestra para la purificación bajo los criterios de cantidad disponible y actividad enzimática cercana a la media.

#### **3.3 Determinación de la estabilidad enzimática en el veneno**

Los ensayos de estabilidad enzimática para hialuronidasa se realizaron a diferentes valores de pH (4,0, 5,0 y 6,0) correspondientes al buffer acetato de amonio 0,05 M y Tris-HCl 0,05 M a pH 7,0. Las concentraciones de NaCl empleadas fueron 0,15 M y 0,3 M de los buffers en los cuales se mantenía el veneno en un rango desde cero hasta ciento sesenta horas monitoreando la actividad enzimática constantemente por el método de Di-

Ferrante (1955). Todos los ensayos de estabilidad se realizaron a temperatura ambiente la cual vario entre 20 y 26 °C.

### **3.4 Purificación de la enzima**

Se diseño un procedimiento que comprendía 2 pasos cromatográficos tal como se indica a continuación:

Se utilizó como primer paso una columna de 46 x 1,7 cm la cual contenía la resina de intercambio anionico DEAE Sephadex A-50 equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5, a temperatura ambiente. A esta columna se aplicaron 100 mg de veneno de disueltos en 2 mL de buffer acetato de amonio 0,05 M, pH 5,0. Se colectaron fracciones de 2 mL a un flujo de 4 mL/hora monitoreando la actividad enzimática mediante el método Di Ferrante y la cantidad de proteína en cada fracción por el método UV y Lowry. La actividad hialuronidasa fue recuperada en el volumen isocrático y las fracciones que contenían la mayor actividad fueron juntadas en un pool para el siguiente paso.

En el segundo paso cromatográfico se empleó una columna de 70 x 0,7 cm con la resina Sephadex G-50 equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M y pH 5,0 a temperatura ambiente. Se colectaron fracciones de 1 mL a un flujo de 4 mL/hora, analizando el contenido de proteína y la actividad en cada fracción por los métodos ya descritos.

### **3.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes**

Este método fue utilizado para determinar la pureza y el peso molecular de la proteína, el cual se basa en la migración de las proteínas parcialmente denaturadas y cargadas negativamente por efecto del SDS, estas migran a través de un gel poroso formado por acrilamida y bis acrilamida gracias a un campo eléctrico que atraviesa el gel.

Cantidades equivalentes a 20 µg de la enzima parcialmente purificada en estudio fueron tratadas con buffer muestra (Tris-HCl 1,5 M pH 6,8, SDS, azul de bromofenol, glicerol y agua destilada) para PAGE-SDS en condiciones reductoras (2-Me) y no reductoras (sin 2-Me).

Se realizaron las corridas electroforéticas en una cámara de electroforesis vertical durante 90 minutos a un voltaje constante de 120 voltios (Laemmli, 1970). Se usaron como proteínas patrones de peso molecular: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lizosima (14,3 kDa). Además del marcador Sigma Perfect Markers de pesos moleculares, 15 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa y 225 kDa.

Después de la corrida, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 0,1% por 15 min y lavados con solución decolorante conteniendo metanol, etanol, ácido acético y agua en proporciones de 20:10:5:65 hasta evidenciar las bandas formadas.

### **3.6 Propiedades bioquímicas**

#### **3.6.1 pH óptimo**

Fue determinado utilizando soluciones buffer con valores desde pH entre 3,5 hasta 8,0. Se empleó: buffer citrato de sodio 0,1 M pH 3,5, buffer acetato de amonio 0,1 M pH 4,0 y 5,0 y buffer Tris-HCl ,1 M pH 6,0, 7,0 y 8,0. Para cada buffer se cuantifico la actividad enzimática.

#### **3.6.2 Efecto de agentes estabilizantes**

Se probaron como agentes estabilizadores de la actividad enzimática el glicerol por reducir la energía cinética de una solución y la glicina por ser un preservante de proteínas usado comercialmente, los cuales se mezclaron en una proporción de 1:1 con la enzima

parcialmente purificada. El glicerol se empleo a una concentración final de 50% y la glicina a una concentración de 10 mM. Luego se midió la actividad enzimática desde tiempo cero hasta 192 horas medidas por el método Di-Ferrante (1955) a temperatura ambiente.

### **3.6.3 Inhibidores**

Los inhibidores empleados fueron: Dexametasona (4,9 y 9,8 mM), 2-Me (3,15, 6,35 y 12,7 mM), Iodoacetato (2, 3, 4 y 5mM), PMSF (1,7, 3,4, 5,1 y 6,8 mM), TLCK (1, 2, 3, 4 y 5 mM), EDTA (2,5, 3,75 y 5 mM) y suero sanguíneo humano 20 mg/mL (Girish y Kemparaju, 2007). Se colocó en viales de 0,5 mL las cantidades de 75 uL de la enzima y 75 uL del inhibidor, incubándose a 37 °C por 15 minutos. Luego se tomaron volúmenes de 50 uL de la mezcla realizando ensayos por triplicado para la prueba de actividad hialuronidasa bajo condiciones de pH óptimo, siguiendo el protocolo de Di-Ferrante (1955).

### **3.7 Efecto difusor de la hialuronidasa**

Usando una variación del método de hemólisis indirecta en placa, que tiene como fundamento la hemólisis indirecta causada la liberación de lisolecitina por efecto de las fosfolipasas presentes en el veneno de *B. atrox* (Inga *et al.*, 2010). Esta técnica permitió comparar el área de hemólisis por el veneno inactivado en presencia y ausencia de la enzima parcialmente purificada evidenciando el efecto difusor de la hialuronidasa. Para lo cual se preparó una mezcla de agarosa al 1,5%, glóbulos rojos humanos lavados al 3%, emulsión lipoproteica de yema de huevo al 3% y ácido hialurónico a 10 mg/mL en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 con NaCl 0,15 M. Esta mezcla se calentó a 40 °C y se depositó en un volumen de 30 mL en una placa Petri estéril donde se dejó enfriar y gelificar. Luego se realizaron orificios de 7 mm de diámetro con ayuda de un sacabocado estéril en los cuales se aplicaron 20 µL de volumen final por pocillo, que contenían 10 µL de muestra completando en algunos casos los volúmenes con solución salina tamponada a pH 7,0.

Las muestras fueron: 10  $\mu$ L de enzima parcialmente purificada, 10  $\mu$ L veneno crudo como control positivo, 10  $\mu$ L de enzima más 10  $\mu$ L veneno inactivado a 60°C por 15 minutos, 10  $\mu$ L de veneno inactivado y 20  $\mu$ L de solución salina como control negativo. Dichas muestras se incubaron en cámara húmeda por 12 horas a temperatura ambiente luego de lo cual, fueron fotografiadas calculándose el área del halo hemolítico con el uso de papel milimetrado.

### **3.8 Inmunodifusión**

Siguiendo la técnica de Ouchterlony y Nilsson (1978) se observó el reconocimiento del veneno de *B. atrox* y de la HA-Ba por los sueros anti-botrópico polivalente y suero anti-lachesico monovalente, los cuales fueron proporcionados por el INS – Lima, para lo cual se utilizó geles de agarosa al 1% en buffer fosfato 0,15 M pH 7,0. Para ello, la agarosa fue disuelta en este buffer por calentamiento a 100 °C por 10 segundos y se colocó 15 ml de esta solución en placas petri dejándose enfriar durante 10 minutos. Luego se hicieron cuatro pocillos equidistantes y dos centrales, colocándose en estos últimos 20  $\mu$ l de suero anti-botrópico polivalente y suero anti-lachesico monovalente. En los pocillos laterales se colocaron respectivamente, 20  $\mu$ L de veneno crudo (5 mg/ml), 20  $\mu$ L de la enzima purificada (0,2 mg/ml), 20  $\mu$ l de solución salina y 20  $\mu$ L de suero humano (20 mg/mL).

La difusión se realizó en una cámara húmeda a 8 °C durante 48 horas luego de lo cual se lavó con citrato trisódico al 5% por 10 minutos y finalmente se realizaron cinco lavados de 6 horas cada uno con NaCl 0,9%. Posteriormente se realizó un lavado con agua destilada durante 10 minutos y se cubrió la lámina con papel filtro humedecido en agua para posteriormente secar la lámina en una estufa a 37 °C por 24 horas. Una vez secos los geles, se procedió a teñirlos con azul brillante de Coomassie al 0,1% por 5 minutos y luego se decoloraron con la misma solución decolorante empleada para electroforesis hasta que se evidenciaron los arcos de precipitación.

### 3.9 Neutralización *in vitro* de la actividad enzimática

La neutralización de la actividad hialuronidasa del veneno y de la enzima purificada fue observada usando los sueros antibotrópico polivalente y antilachesico monovalente del INS – Lima; también se estudio el efecto neutralizante de los sueros IgY anti-*Bothrops atrox* y anti-*Lachesis muta muta* de origen aviar obtenidos a partir de huevos de gallinas inmunizadas, técnica recientemente desarrollada en el LBM de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Para ello se prepararon mezclas con diluciones de dichos sueros en una proporción de 1:1 suero a veneno ó HA-Ba, incubándose 30 minutos a 37 °C. Inmediatamente después se midió la actividad enzimática por el método turbidimétrico (Di Ferrante, 1955). Las diluciones se probaron desde 1/2 hasta 1/8 hasta encontrar la cantidad de suero que causara una reducción de la actividad hialuronidasa hasta 50%.

## RESULTADOS

**Cuantificación de proteína.-** Determinada la absorbancia de la proteína directamente a 280 nm se obtuvo que 1 mg/mL del veneno liofilizado de *Bothrops atrox* tiene una absorbancia de 0,915 mg/mL y por el método de Lowry, se obtuvo que 1 mg de veneno contiene 0,827 mg de proteína. Esto quiere decir que el porcentaje de contenido proteico en el veneno por este último método es de 82,7%.

**Actividad hialuronidasa de veneno de *Bothrops atrox*.-** La tabla 1 indica la actividad hialuronidasa de 12 venenos de la serpiente *Bothrops atrox* de diferente procedencia calculadas empleando el método turbidimétrico de Di Ferrante (1955), obteniéndose variaciones en la actividad específica en el rango de 8,55 a 15,72 UDF/mg con una media de 11,98 y una desviación estándar de 1,76. Para la purificación se seleccionó la muestra que mostro una actividad específica de 11,7 bajo los parámetros ya descritos anteriormente.

**Estabilidad de la actividad enzimática en el veneno de *B. atrox*.-** La figura 1 muestra los datos obtenidos al ensayar la actividad hialuronidasa en los buffers acetato de amonio y Tris-HCl en función del tiempo a diferentes valores de pH donde se observo que a pH 5,0 la actividad se mantiene en un porcentaje de 70% luego de 156 horas de exposición a temperatura ambiente en tanto que, a pH 6,0, la estabilidad es menor puesto que, la actividad se mantiene solo en un 27%. Al pH 4,0 y 7,0 respectivamente, la actividad decrece rápidamente quedando anulada para ambos valores de pH en el periodo de tiempo ya indicado.

Así mismo cuando se varía la concentración salina entre 0 y 0,3 molar manteniendo el pH de 5 y en un periodo de tiempo de 156 horas (Figura 2); se puede notar un descenso de la actividad de 44% en ausencia de sal en tanto que los descenso son mayores, 68 y 84% a

concentraciones de cloruro de sodio de 0,15 y 0,3 M respectivamente. Estos resultados indican que la presencia de NaCl en tiempos prolongados no contribuye a la estabilidad de la enzima sino más bien, la afecta. Es interesante también observar que la adición inicial de la sal (tiempo cero) incrementó la actividad hialuronidasa en porcentajes de 15 y 18% para 0,15 y 0,3 M respectivamente.

**Purificación.-** Al realizar el primer paso (Figura 3) usando la columna de intercambio aniónico DEAE Sephadex A-50, se obtuvieron 5 picos de proteína en el volumen isocrático. Después de agregar buffer con 0,3 M de NaCl se obtuvieron 2 picos consecutivos, siendo el segundo de mayor tamaño. Con el cambio de sal a 0,6 M, se resolvió un pequeño pico adicional de proteína.

La actividad enzimática se registro en el segundo pico del volumen isocrático, obteniéndose una purificación inicial de 25 veces, un rendimiento de 50% y una recuperación de proteína de 2%. Así mismo se determino el comportamiento electroforético de las fracciones del correspondiente pico (Figura 4).

En el segundo paso (Figura 5) usando un sistema de filtración molecular sobre Sephadex G-50, se resolvieron 5 picos. La actividad enzimática se encontró en la subida del segundo pico con un valor de 1157 UDF/mg lo que significa, una purificación total de 145 veces, un rendimiento de 72% y 0,5% de proteína activa recuperada (Tabla 2). Los ensayos en PAGE-SDS mostraron que la enzima fue purificada parcialmente (Figura 6).

**Peso molecular.-** Los ensayos electroforéticos mostraron que la banda proteica con un peso molecular de 110 kDa en presencia de SDS en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 7) correspondía a la enzima en estudio ya que se la registro como una banda principal con ligeros contaminantes. La banda principal fue denominada HA-Ba.



## **Propiedades bioquímicas de la HA-Ba**

**pH óptimo.-** La enzima purificada parcialmente mostró tener actividad hidrolítica sobre el ácido hialurónico en el rango de pH 4,0 a pH 7,0 en buffer acetato de amonio, siendo la máxima actividad a pH 6,0 para las pruebas realizadas en presencia de 0,15 M NaCl y en ausencia de NaCl, tal como se muestra en las figuras 8 y 9 respectivamente.

**Estabilidad de la HA-Ba.-** La enzima preparada en buffer acetato de amonio a pH 6,0 con y sin NaCl 0,15 M perdió totalmente su actividad después de 48 horas mientras que la proteína a pH 5,0 evidenció 60% de actividad inicial en el mismo lapso de tiempo (Figura 10). Por otra parte, el empleo del buffer acetato de amonio pH 5,0 0,05 M en presencia de glicerol al 50% o de glicina al 10 mM, no estabilizan la actividad enzimática ya que se observa la pérdida total de actividad después de 48 y 192 horas respectivamente (Figura 10 y Tabla 3).

**Inhibidores enzimáticos.-** La actividad hialuronidasa se inhibió hasta 100% al mezclar la enzima con suero sanguíneo humano a 20 mg/mL. Así mismo la enzima fue inhibida en un 75% usando dexametasona 4,9 mM. También se obtuvo una inhibición de 48% empleando EDTA 5 mM, en tanto que TLCK 5 mM con 60% y de 39% por acción del iodoacetato 4 mM.

Por otra parte, 2-Mercaptoetanol y el PMSF no ejercieron ningún efecto observable in vitro, sobre la actividad de la enzima (Tabla 4). Indicando que para la actividad enzimática de la HA-Ba son importantes los iones metálicos, los residuos aminoácidos Tyr, His, Phe y Cys.

**Efecto difusor de la HA-Ba.-** El veneno de *Bothrops atrox* causó un área de difusión (AD) de 24mm<sup>2</sup> (100%), en tanto que, el veneno inactivo por calor dio 15mm<sup>2</sup> (40%). Por otra parte, el veneno inactivado junto con la hialuronidasa purificada dio 22mm<sup>2</sup> (87%), la

enzima purificada mostró un halo de 11mm<sup>2</sup> (13%) y el control (solución salina) un AD de 0mm<sup>2</sup> (Figura 11). Esto quiere decir, que se incrementó en más de 100% el área de difusión de la mezcla de veneno inactivado por calor con hialuronidasa frente a la que no contenía a la enzima.

### **Propiedades inmunoquímicas del veneno total y de la enzima HA-Ba.-**

Inmunodifusión.- El veneno de *B. atrox* exhibió varias bandas de precipitación frente al suero equino anti-botrópico-INS y al suero equino anti-lachesico-INS). En cambio, la enzima HA-Ba mostró una sola banda de precipitación frente al suero anti-botropico-INS y al suero anti-lachesico-INS (Figura 12).

**Neutralización de la actividad hialuronidasa del veneno de *B. atrox* con anticuerpos.-** Los anticuerpos policlonales aviares IgY contra *B. atrox* mostraron una neutralización de la actividad hialuronidasa con una reducción de 50% en la actividad enzimática para una proporción de 1800 uL de IgY por mg de veneno mientras que los anticuerpos policlonales aviares IgY contra *L. muta* causaron una reducción de 50% en la actividad enzimática para una proporción de 400 uL de IgY por mg de veneno.

Por otro lado, el suero antibotropico polivalente-INS y el que el suero antilachesico monovalente-INS provocaron una reducción de 50% en la actividad de la HA-Ba a una proporción de 192 uL y 80 uL de suero por mg de veneno (Tablas 5 y 6).

Así mismo, los anticuerpos policlonales aviares IgY contra *B. atrox* y *L. muta* mostraron una neutralización de la actividad hialuronidasa con una reducción de 50% en la actividad enzimática para una proporción de 7000 uL y 4500 uL de IgY por mg de enzima. Así mismo, el suero antibotropico polivalente-INS y el que el suero antilachesico monovalente-INS provocaron una reducción de 50% en la actividad de la HA-Ba a una proporción de 2200 uL y 200 uL por mg de HA-Ba (Tablas 5 y 6).

## DISCUSIÓN

### CONTENIDO PROTEICO

Gran parte de los componentes sólidos del veneno (90%) son proteínas y péptidos responsables de los síntomas durante el envenenamiento en humanos (Stocker, 1974). Además se reporta una variación en la concentración de estos componentes causados por diferentes factores tales como poblaciones diferentes, sexo, edad y estado fisiológico del animal (Chippaux *et al.*, 1991). A esto se le suma la pérdida de proteína por degradación luego de un proceso de liofilizado y las variaciones individuales del veneno empleado. Liman (1996) reportó para *B. brazili* un contenido proteico de 92%, mientras que Cardenas (1993) señaló 69% para *B. atrox*, 63% para *B. pictus* y 77% para *Crotalus durissus terrificus*. Roncalla *et al.*, (1989) registraron 43% para *B. atrox* contrastando con la presente investigación donde se encontró un 82% de contenido proteico, exhibiendo la variación que suele encontrarse en el contenido proteico.

Estas variaciones del contenido proteico suelen ser más frecuentes cuando se realiza la liofilización tal como señalan Chippaux *et al.*, (1991) quienes encontraron valores de 74% para *B. barnetti*, *B. atrox* 78%, *B. brazili* 83%, *B. pictus* 69% y *Lachesis muta* 85% cuyos resultados se aproximan a los obtenidos en la presente investigación. Todos los ejemplos anteriores emplearon el método de Lowry para la cuantificación proteica lo que hace posible una comparación efectiva.

## VARIACIÓN DE HIALURONIDASA EN EL VENENO OFIDICO

La composición del veneno ofídico es una mixtura rica en proteínas y aminoácidos que presenta variaciones intraespecíficas e interespecíficas, las cuales ocasionan problemas al momento de neutralizar los efectos tóxicos durante el envenenamiento en humanos siendo los mecanismos de esta variación solo parcialmente entendidos (Earl *et al.*, 2006).

Durante la evolución, los reptiles venenosos optaron por tomar varias moléculas reguladoras de numerosas rutas metabólicas para reclutarlas como constituyentes del veneno (Fry, 2005). La selección evolutiva parece haber limitado la diversidad de proteínas del veneno a una corta lista de grupos enzimáticos (Calvete *et al.*, 2007) que son objeto de una rápida evolución *in situ* (Fry *et al.*, 2008), resultando en la producción de muchas actividades biológicas y enzimáticas bajo estructuras moleculares conservadas. Estas modificaciones estructurales de proteínas primigenias, se observan en varios grupos enzimáticos del veneno entre las que resaltan las toxinas de tres dedos ó 3FTXs en las siglas en ingles (Kini, 2002; Pawlak *et al.*, 2006, 2009), las fosfolipasas A<sub>2</sub> (Nakashima *et al.*, 1995; Kini, 1997; Chuman *et al.*, 2000), muchas serino-proteasas que afectan la homeostasis (Deshimaru *et al.*, 1996; Serrano y Maroun, 2005), las proteínas ricas en cisteína ó CRISPs en las siglas en ingles (Yamazaki y Morita, 2004), desintegrinas (Juárez *et al.*, 2008) y posiblemente hialuronidasas (Tabla 1). Bajo este criterio, las hialuronidasas presentes en venenos aún se encuentran en una etapa muy temprana de estudio como lo señala El-Safory *et al.*, (2010). Esta enzima a pesar de su importancia ha sido poco estudiada debido a su inestabilidad.

## PURIFICACIÓN

El análisis de proteínas, en pequeña o gran escala, requiere de métodos que no solo permitan cuantificarlas sino separarlas e identificarlas, esto último solo se logra usando los distintos tipos de cromatografía. El tipo más empleado de cromatografía es la líquida por su versatilidad y compatibilidad con la espectrometría de masas.

Para el caso de los venenos de origen animal, las técnicas de purificación más usadas son las cromatografías de filtración molecular, las de intercambio iónico y las cromatografías líquidas de alta presión o HPLC. La selección apropiada de una de ellas o la combinación de las mismas, permiten separar las proteínas ofídicas y con ello, poder estudiar sus características.

El aislamiento de una hialuronidasa presente en el veneno *B atrox*, empleó como primer paso una columna de intercambio anionico, DEAE Sephadex A-50 (Figuras 3 y 4) y una Sephadex G-50 (Figuras 5 y 6) como segundo paso, lográndose una purificación parcial de 145 veces con un rendimiento de 72% (Tabla 2) en comparación con el aislamiento de *Agkistrodron contortrix contortrix* donde se obtiene una purificación de 277 veces con un rendimiento del 16,6% empleando Sephacryl S-200 HR y CM-Sephadex C-25 como primer y segundo paso respectivamente (Kudo y Tu, 2001), cabe mencionar que Girish y col. (2004) obtienen una purificación de 33 veces con un rendimiento de 5% para la NNH1 y 27 veces con rendimiento de 0,35% para la NNH2, ambas hialuronidasas presentes en el veneno de *Naja naja*, mediante el empleo de Sephadex G-75 y CM-Sephadex C-25. Es interesante señalar que en la presente investigación el rendimiento después del 1er paso fue de 50% y se incremento a un 72% después del 2do paso lo que sugiere la existencia de un inhibidor que podría estar desligándose de la hialuronidasa en este último paso, siendo esto algo que no se

observa en los trabajos mencionados para *A. contortrix contortrix* y *N. naja* y tampoco en la purificación presentada por Lerma (2006) donde obtiene un rendimiento de 24% para la especie *Lachesis muta*.

En relación a otras hialuronidasas purificadas con metodologías similares es posible mencionar a la NNH1 y NNH2, presentes en el veneno del elapido *Naja naja*, purificadas en dos pasos, primero por filtración molecular con un rendimiento de 34% seguido de un segundo paso empleando una columna de intercambio catiónico con un rendimiento de 5% que es mucho menor al 72% logrado en el presente trabajo y una recuperación de proteína de 0,15% para NNH1. Para la NNH2 se reportó un rendimiento de 0,35%, también muy inferior al de esta investigación. Así mismo los valores de recuperación de proteína activa de 0,1 y 0,01% para la NNH1 y la NNH2 de *N. naja* (Girish *et al.*, 2004b) son igualmente menores al 0,5% encontrado por nosotros.

En el veneno de *A. contortrix contortrix* se encontró una hialuronidasa la cual fue purificada mediante una filtración molecular sobre Sephacryl S-200 HR y un intercambiador catiónico CM-Sephadex C-50 con un rendimiento de 16,6% y una recuperación de proteína de 0,1% (Kudo y Tu, 2001). En el vipérido peruano *L. muta muta*, se purificó una hialuronidasa con un rendimiento de 39% (Hurtado *et al.*, 2007) y 24% (Lerma, 2006) obtienen cantidades de enzima hialuronidasa recuperada del veneno de *L. muta muta* de 0,8 % junto con la recuperación proteica de 0,5% del presente trabajo indicarían una mayor abundancia de hialuronidasa en venenos de vipéridos que en elápidos. Es interesante mencionar que además de los reportes mencionados, no existen otros estudios sobre hialuronidasa de venenos ofídicos lo cual abre un camino para una vasta investigación sobre una proteína de gran importancia en el fluido tóxico.

La hialuronidasa de escorpión negro *Palamneus gravimanus* (Morey *et al.*, 2006) también se purificó en 2 pasos cromatográficos, empleando primero Sephadex G-75 con un

rendimiento de 64%, y un segundo paso sobre DEAE Celulosa con un rendimiento de 39,2% y una recuperación de proteína del 2,5% en contraste con la cantidad encontrada en el himenóptero *Apis* puede llegar al 20% en el veneno (Markovic *et al.*, 2000). Un dato controversial es el hallazgo de un valor de 0,4% de hialuronidasa para la araña *Hippasa partita* lo cual podría estar ligado a su inestabilidad durante su purificación, es decir no necesariamente al bajo contenido de la enzima (Nagaraju *et al.*, 2007). En comparación con el presente trabajo podemos concluir que la enzima es más abundante en artrópodos que en reptiles, como un ejemplo más de la variación en la cantidad de esta enzima presente en diferentes venenos.

Es importante remarcar que siendo hialuronidasa una enzima específica para la hidrólisis del ácido hialurónico, principal componente del tejido conectivo, su concentración y actividad van a estar ligadas a la necesidad de difundir el veneno en la víctima. En pocas palabras, por cada gramo de veneno de *B. atrox* la serpiente estaría inyectando 5 mg de hialuronidasa.

Una vez purificada parcialmente la hialuronidasa usando PAGE-SDS se determinó un peso molecular de 110 kDa para la proteína en estudio tanto en presencia como en ausencia de 2-ME (Figura 7). Así encontramos un amplio rango de peso molecular para hialuronidasas ya que para el vipérido *L.s muta muta* se indica un peso de 47 kDa (Hurtado 2007), donde Lerma (2006) señala 65 kDa, mientras que Cevallos *et al.*, (1992) mediante zimogramas en geles de acrilamida determina un peso de 115 kDa para *Lachesis muta*, 137 y 113 kDa para *B. asper*, 73 y 108 kDa para *Crotalus basiliscus*. Por otro lado, se encuentra un peso de 59,3 kDa para *A. contortrix contortrix* (Kudo y Tu, 2001) mientras que la enzima aislada de *A. acutus* presenta un peso molecular bajo de 33 kDa (Xu *et al.*, 1982). Para la familia Elapidae se conocen dos hialuronidasas, una de 70 kDa y otra de 52 kDa en el veneno de la cobra *N. naja* (Girish *et al.*, 2004, 2005a). Esto

pone en duda la hipótesis de un modelo general para este grupo de enzimas propuesto por Harrison *et al.*(2007), donde trabaja con las especies *Bitis arietans*, *Cerastes cerastes*, *Daboia russellii*, *Crotalus atrox*, *Bothrops jararaca*, *Echis ocellatus*, *Echis leucogaster* y *Echis pyramidum leakeyi*, obteniendo un rango entre 50 y 75 kDa de peso molecular por medio de zimogramas y atribuye que las variaciones del peso molecular se deben al grado de glicosilación de estas moléculas, punto que aún se encuentra bajo estudio. Probablemente el modelo propuesto por Harrison *et al.*, se ajuste para la descripción del sitio activo ya que los inhibidores empleados en la presente investigación inhiben la actividad enzimática adhiriéndose a residuos aminoácidos Tyr y Cys coincidiendo con los propuestos por el modelo de Harrison *et al.* (2007).

#### **ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD HIALURONIDASA EN EL VENENO Y EN LA ENZIMA (HA-Ba)**

La hialuronidasa del veneno de la serpiente *B. atrox* tiende a ser inestable en el tiempo, con una reducción en su actividad, esto es reportado por Hurtado *et al.*, (2007) para el vípérido *L. muta muta* y curiosamente también en la hialuronidasa del lagarto *Heloderma horidum horidum* (Tu y Hendon, 1983). Cabe mencionar que los trabajos mencionados no entran en detalles sobre la estabilidad a diferencia de la presente investigación y solo comentan sobre las dificultades en el proceso de purificación de la enzima debido a su inestabilidad. Por otro lado tenemos referencias de la inestabilidad de la actividad hialuronidasa de serpientes asiáticas (Pukrittayakamee *et al.*, 1988) y en ausencia de detergentes o inhibidores de proteasas (Csoka *et al.*, 2001), pero estos trabajos tampoco realizan ensayos detallados al respecto. En el presente trabajo se determinó la estabilidad de la actividad enzimática frente a diferentes niveles de NaCl y pH (Figuras 1, 2 y 9), lo cual al compararla con los trabajos mencionados indica que efectivamente el NaCl incrementa la actividad de estas enzimas a pesar de encontrarse en diferentes grupos



animales y es común encontrar un pH óptimo entre 5,0 y 6,0 (Figuras 8 y 9). Este panorama al extrapolarlo a la acción de la enzima durante el envenenamiento permite especular sobre la necesidad de una enzima con una elevada actividad y una pobre estabilidad en el tiempo ya que su efecto solo sería necesario al inicio del envenenamiento con acción sobre el tejido cercano a la mordedura debido a su inactivación al ingresar al sistema circulatorio por efecto de proteínas séricas de la familia inter alfa inhibidores. Esto también explicaría la cantidad presente en el veneno de ofidios (Harrison *et al.*, 2007).

Las hialuronidasas pertenecen al E.C. 3.2.1.35 de acuerdo a la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZY). Estas clivan los enlaces glicosidicos beta-1, 4 del ácido hialurónico en forma aleatoria en un proceso no endolítico produciendo tetrasacaridos como producto final de la reacción (Stern y Jedrzejewski, 2006). Los detalles de sobre la estructura de estas enzimas aún se encuentran en discusión (El-Safory *et al.*, 2010; Stern, 2003) pero se conoce una gran cantidad de inhibidores de este grupo de enzimas tales como heparina (Wolf *et al.*, 1984) que se une no covalentemente a la superficie de la enzima y no a su sitio activo, de igual manera un inhibidor circulante en suero de mamíferos perteneciente a la familia de proteínas séricas inter alfa inhibidores (Haas, 1946). Además de otros de origen sintético o vegetal, tales como anti-oxidantes (Botzki *et al.*, 2004), anti-inflamatorios (Mio y Stern, 2002), alcaloides (Szary *et al.*, 1975; Girish y Kemparaju, 2005a) y otros listados por Girish y Kemparaju (2007). Los inhibidores son importantes para el diseño de mejores métodos para el tratamiento del envenenamiento mediante la neutralización de estas enzimas como lo demuestran los inhibidores de la hialuronidasa reportados en la presente investigación (Tabla 4), tales como la dexametasona, el cual podría emplearse en el tratamiento de mordeduras

podrían ayudar a reducir las lesiones dérmicas mejorando la recuperación de los pacientes y la eficiencia de los sueros anti-ofídicos.

## **ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Hasta la fecha, no se ha demostrado que las hialuronidasas presenten toxicidad (Girish, 2004a), pero son potenciadores de la toxicidad del veneno gracias a su papel difusor de los componentes tóxicos (Xu *et al.*, 1982; Tu y Hendon, 1983; Pukrittayamke *et al.*, 1988; Yingprasertchai *et al.*, 2003 y Kemparaju y Girish, 2006). Al no poseer toxicidad propia se han diseñado métodos que evalúan la actividad potenciadora de la hialuronidasa respecto a actividades tóxicas de enzimas conocidas, observa que incrementa la actividad creatina fosfoquinasa y el daño hemorrágico causado por miotoxinas (Girish *et al.*, 2004b). Lerma en el 2006 realizó la evaluación de la actividad hemolítica indirecta incluyendo el sustrato de hialuronidasa, es decir ácido hialurónico en placas de hemólisis. De acuerdo con ello, se puede observar el efecto difusor de la hialuronidasa en el incremento del halo hemolítico para el veneno crudo y la enzima purificada de *L. muta*. En comparación con el presente trabajo donde se utilizó una técnica similar para evaluar el efecto de la hialuronidasa aislada del veneno de *B. atrox* en relación al veneno encontrándose también un incremento en el área de hemólisis (Figura 11), es interesante señalar el efecto potenciador sobre otras enzimas del veneno en el incremento del área hemorrágica obtenida en otras investigaciones (Girish *et al.*, 2004b).

## **INMUNOGENICIDAD**

Los antivenenos o sueros antiofídicos son la forma más eficiente y directa para el tratamiento de mordeduras por serpientes venenosas. Lamentablemente la mayoría de sueros antiofídicos a generan una pobre protección frente al daño del tejido local

adyacente a la mordedura (Lomonte *et al.*, 1996; Leon *et al.*, 1999 y 2000), por lo que la inhibición de la hialuronidasa no solo generaría una protección del tejido local adyacente a la zona de la mordedura sino que, también retardaría la muerte en casos de envenenamiento (Yingprasertchai *et al.*, 2003; Girish y Kemparaju, 2005b y 2006).

Actualmente los sueros antiofídicos otorgan protección frente a las principales actividades tóxicas responsables de la sintomatología del envenenamiento ofídico (Garcia *et al.*, 2008; Yarleque *et al.*, 2008). Siendo dicha protección más eficiente en el tratamiento de mordeduras de especies del mismo género, se obtiene una pobre reactividad cruzada (4%) entre los venenos de las serpientes *B. atrox* y *L. muta* (Sandoval, 2010); en cambio el grado de neutralización de la actividad hialuronidasa por parte de ambos sueros frente a la HA-Ba indicaría que a pesar de la poca reactividad cruzada, ambos sueros son capaces de neutralizar a esta enzima (Tablas 4 y 5).

La presente investigación muestra que los sueros anti-botrópicos y anti-lachesicos respectivamente pueden reconocer (Figura 12) y neutralizar la actividad hialuronidasa y de manera semejante otras actividades enzimáticas (Ortiz *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2010), a pesar de las diferencias en la composición proteica de estos venenos (Mendoza *et al.*, 2008). Es interesante señalar que una neutralización de la actividad hialuronidasa también ocurre al emplear sueros aviares, dato importante para el diseño de sueros antiofídicos y que no ha sido estudiado antes.

## CONCLUSIONES

1. El veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* con una composición proteica de 82% posee una enzima hialuronidasa y es posible purificarla parcialmente mediante dos pasos cromatográficos usando una columna de DEAE Sephadex A-50, seguida de una columna de Sephadex G-50.
2. Estructuralmente la enzima es una proteína monomérica básica con un alto peso molecular de 110 kDa, es inhibida por suero humano, y los residuos Tyr y Cys son importantes para su actividad enzimática.
3. La enzima parcialmente purificada es estable en el rango de pH 4,0 a 7,0, tiene pH óptimo de 6,0, es termolábil con una actividad específica de 1157 y fue obtenida con un rendimiento de 72%.
4. La enzima parcialmente purificada posee un efecto difusor que incrementa la hemólisis indirecta "*In vitro*".
5. El suero antitropico polivalente, antilachesico y sueros aviares antitropicos y antilachesicos neutralizan la actividad enzimática en dosis variables.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTZKI, A., RIGDEN, D.J., BRAUN, S., NUKUI, M., SALMEN, S., HOECHSTETTER, J., BERNHARDT, G., DOVE, S., JEDRZEJAS, M.J. and BUSCHAUER, A. L-Ascorbic acid, 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme–inhibitor complexes. *Journal of Biological Chemistry* 2004, vol. 279, 45990–45997.

CÁRDENAS, J. Estudio proteico y enzimático en el veneno de tres especies de serpientes mantenidas en cautiverio. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo, 1993. UNAS Arequipa- Perú.

CEVALLOS M. A., NAVARRO-DUQUE, C., VARELA-JULIA M., and ALAGON, C. molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Toxicon* 1992. Vol. 30: 925-930.

CHIPPAUX, J.; WILLIAMS, V., and WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 1991. Vol. 29: 1279-1303.

CHEONG, H., RANGANATHAN, S., CHUA, K., and KHOO, H. Cloning and molecular characterization of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of stonefish (*Synanceja horrid*). *Gene* 2005. Vol. 346: 71-81.

CHUMAN, Y., I. NOBUHISA, T. OGAWA, M. DESHIMARU, T. CHIJIWA, N. H. Tan, Y. FUKUMAKI, Y. SHIMOHIGASHI, F. DUCANCEL, J. C. BOULAIN, A. MÉNEZ, and M. OHNO. Regional and accelerated molecular evolution in group I snake venom gland phospholipase A2 isozymes. *Toxicon* 2000, vol. 38:449-462.

CSOKA, A. B., FROST, G.I., and STERN, R.,. The six Hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology* 2001, vol. 20, 499-508.

DA SILVA, M. H., and GULMERME, O.. Titration of antiserum to south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A2 activity. *Toxicon* 1981, vol. 20: 563-569.

DAY, A. J., and C. A. de la MOTTE. Hyaluronan cross-linking: A protective mechanism in inflammation. *Trends immunol* 2005, vol. 26:637-43.

DESHIMARU, M., T. OGAWA, K. NAKASHIMA, I. NOBUHISA, T. CHIJIWA, Y. SHIMOHIGASHI, Y. FUKUMAKI, M. NIWA, I. YAMASHINA, S. HATTORI, and OHNO. Accelerated evolution of Crotalinae snake venom gland serine proteases. 1996. *FEBS let.* 397:83-88.

DI FERRANTE, N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Medical Research* 1955. 303-306.

DURAN-REYNALS, F.. Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organs. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales* 1928 vol. 99, 6–7.

ETESSE, E.; BEAUDROIT, L.; DELEUZE, M; NOUVELLON, E., and RIPART, J. Hyaluronidase: plaidoyer pour un retour. *Annales Francaises d' Anesthésie et de Réanimation* 2009. Vol. 28: 658-665.

EL-SAFORY, N.; AHMED E., and CHENG-KANG L. Hyaluronidases, A group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrates polymers* 2010. Vol. 10: 1016-1070.

FRY, B. G. 2005. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 15:403-420.

FRY, BRYAN G.; SCHEIB, H., WEERD, L., YOUNG, B., MCNAUGHTAN., J., RAMJAN RYAN S. F., and VIDAL, N., POELMANN, R. E. and NORMAN, J. A. Evolution of an Arsenal. *Molecular & Cellular Proteomics* 2008. Vol. 7.2: 215-246.

FRY, BRYAN G., ROELANTS, K., and NORMAN, J. A. Tentacles of venom: Toxic protein convergence in the kingdom animalia. *J Mol Evol* 2009. DOI 10.1007/s00239-009-9223-8

FENG, LUO; GAO, RONG., and GOPALAKRISHNAKONE, P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2008. Part C 148: 250-257.

GARVIN, JAMES H. JR; and CHIPMAN D. M. Subunit structure of testicular hyaluronidase. *FEBS Letters*, 1974, vol. 39(2): 157-159.

GARCIA, P. J., A. YARLEQUE., C. BONILLA-FERREYRA., PESSAH S. D. VIVAS., G. A. SANDOVAL y F. LAZO. Características bioquímicas y evaluación preclínica de un antiveneno botropico liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2008. Vol. 25(4): 386-90.

GIRISH, K. S.; JAGADEESHA, D.K.; RAJEEV K.B. and KEMPARAJU, K. 2002. Snake venom hyaluronidase: An evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 240: 150-110.

GIRISH, K. S. Isolation, characterization and inhibition of Hyaluronidase from Indian cobra (*Naja naja*) PhD Thesis submitted to University of Mysore, 2004a.

GIRISH, K. S. SHASHIDHARAMURTHY, S. NAGARAJU, T. V. GOWDA, K. KEMPARAJU. Isolation and characterization of Hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie* 2004b. vol. 86: 193-202.

GIRISH, K. S., and KEMPARAJU K. A low molecular weight isoform of hyaluronidase: Purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. *Biokhimiya*, 2005a, Vol. 70, No. 6: 855-860.

GIRISH, K. S. and KEMPARAJU, K.. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. *Biokhimiya*, 2005b, Vol. 70, No. 8: 1145-1150.

GIRISH, K. S. AND KEMPARAJU K. 2006. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: Roles in the management of poisonous bite. *Life sciences* 78: 1433-1440.

GIRISH, K. S. AND KEMPARAJU K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life sciences* 2007. Vol. 80: 1921-1943.

GONZALEZ E, HUARI F, ORTIZ C, LAZO F, BELLIDO M, PALOMINO J, SILVA J, MENDOZA J, YARLEQUE A. Neutralización de algunas actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Lachesis muta* por antivenenos de origen equino y aviar. *XIX RC-ICBAR UNMSM*, 2010. *Libro de resúmenes* (p: 117)

GMACHL, MICHAEL and KREIL GUNTHER. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90: 3569-3573.

GUÉRCIO, R. A. P., A. SHEVCHENKO, A. SHEVCHENCKO, J. L. LÓPEZ-LOZANO, J. PABA, M. V. SOUSA, and C. A. O. Ricart. Ontogenic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci*. 2006. vol. 4:11-25.

HAAS, E. On the mechanism of invasion. I. Antinvasin I, An enzyme in plasma. *Journal of Biological Chemistry* 1946. Vol. 164, 63–88.



HARRISON, ROBERT A.; IBSON, FRANCES. WILBRAHAM, DAVINA., and WAGSTAFF, SIMON C. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: Cross-generic sequence conservation of full length and unusually short variant transcripts. *Gene* 2007. Vol. 392: 22-23.

HOFINGER, EDITH S. A.; HOECHSTETTER, JULIA; OETTL, MARTIN; BERNHARD, GUNTHER. and BUSCHAUER ARMIN. Isoenzyme-specific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases. *Glycoconj J* 2008. Vol. 25:101-109.

HURTADO, L.; LERMA, L.; RODRIGUEZ, E. y YARLEQUE, A. Evaluación Aislamiento y algunas propiedades bioquímicas de una hualuronato glucanohidrolasa del veneno de la serpiente Peruana *Lachesis muta* "Shushupe". *Rev Soc Quim Peru.* 2007, 73, N°4 (226-234)

INGA, R; VIVAS, D; PALERMO, P; MENDOZA, J; LAZO, F. y YARLEQUE A. Biological characterization and inhibitors action of Phospholipase A2 from *Lachesis muta* venom. 2010. *Rev. peru. biol.* 17(1): 123-128.

JHONSTON, JAMES E. and MIXNER, JOHN P. New Jersey Agricultural Experiment Station 1950, Sussex: 116-119.

JUÁREZ, P., I. COMAS, F. GONZÁLEZ-CANDELAS, and J. J. CALVETE. Evolution of snake venom desintegrins by positive Darwinian selection. *Mol. Biol. Evol.* 2008. Vol. 25:2391-2407.

KEMPARAJU, K. AND GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell biochemistry and function*; 2006. Vol. 24: 7-12.

KINI, R. M. Venom phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism. New York:Wiley. 1997.

KINI, R. M. Molecular molds with multiple missions: Functional sites in three-finger toxins. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2002, vol. 29:815-822.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A. and JEYASEELAN, K. 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell. Mol. Life Sci. 63: 3030-3041.

KREIL, GUNTHER. Hyaluronidases – A Group of neglected enzymes. Protein Science 1995. Vol. 4: 1666-1669.

KOLARICH, D., R. LEONARD, W. HEMMER, and F. ALTMANN. 2005. The N-glycans of jellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its isoform in *vespula vulgaris*. FEBS J. 272:5182-90

KUDO, KENZO and TU, ANTHONY T. Characterization of Hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2001. Vol. 386, No2: 154-162.

LAEMMLI U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970. vol. 227, 680 – 685.

LAING G. D., YARLEQUÉ, A., MARCELO, A., RODRIGUEZ, E., WARRELL D.A. Y THEAKSTON R.D.G. 2004. Preclinical testing of three South American antivenoms against the venoms of five medically – important Peruvian snake venoms. *Toxicon*. Vol. N°44 pp 103-106.

LISANTI, VINCENT F. Hyaluronidase activity in human saliva. J DENT RES 1950. Vol. 29:392-395.

LEON, G., B. STILES, A. ALAPE, G. ROJAS and J. M. GUTIERREZ. Comparative study on the ability of IgG and F(ab')<sub>2</sub> antivenom to neutralize lethal and myotoxic effects

induced by *Micrurus nigricictus* (coral snake) venom. Am J. Trop. Med. Hygiene 1999. Vol. 61:266-71.

LEON, G. J. M. VALVERDE, G. ROJAS, B. LOMONTE, and J. M. GUTIERREZ. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and mionecrosis induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. Toxicon 2000. Vol. 38:233-44.

LERMA, LUIS M. Evaluación bioquímica y biológica de una hialuronidasa del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Tesis para optar el título profesional de biólogo con mención en biología celular y genética, 2006. (UNMSM).

LIMAN, J. Purificación y Caracterización parcial de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops brazili*. Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en Genética. 1996. UNMSM. Lima – Perú.

LOKESHWAR, VINATA B. and SELZER, MARIE G. Hyaluronidase: Both a tumor promoter and suppressor. Semin Cancer Biol. 2008. Vol. 18(4): 281-287

LOMONTE, B., G. LEON y L. B. HANSON. Similar effectiveness of Fab and F(ab')<sub>2</sub> polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema and mionecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon 1996. Vol. 35:1627-37

LOMONTE, B. 2002. Manual de métodos inmunológicos. Universidad de Costa Rica 138 pp. Folleto mimeografiado. Capítulo 13: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida, pp.92-101.

Mackessy, S. P., and L. M. Baxter. 2006. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. Zool. Anzweiger 245:147-159.

MAGALHAES, MARTA R.; DA SILVA JR., NELSON J., and ULHOA, CIRANO J. A Hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (Freshwater stingrays) venom: Isolation and Characterization. *Toxicon* 2008. Vol. 51: 1060-1067.

MARKOVIC-HOUSLEY, ZORA.; MIGLIERINI, GUILIANA; SOLDATOVA, LYUDMILA; RIZKALLAH, PIERRE J.; MULLER, ULRICH and TILMAN SCHIRMER. Crystal structure of Hyaluronidase a Major Allergen of Bee Venom. *Structure*, 2000. Vol. 8: 1025-1035.

MATYSIAK, JAN.; SCHMELZER, E. H. C.; REINHARD, H. H.; NEUBERT, KOKOT, and ZENON J. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. vol. 54(2):273-278.

MENZEL, E. J. and FARR, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer letters* 1998. Vol. 131: 3-11.

MENDOZA, J.; LAZO, F.; YARLEQUE, L.; RUIZ, N.; YARLEQUE, A.; PESSAH, S.; FLORES, v.; BONILLA, C. Efecto del antiveneno botropico sobre las actividades de Fosfolipasa A2, L-aminóacido oxidasa y hialuronidasa de los venenos de serpientes peruanas. 2008. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública* 25(2): 174-78.

MENDOZA J, GONZALEZ E, RUIZ N, ARBAIZA L, SEVERINO R, and YARLEQUE A. 2008. Patrones electroforéticos comparativos de los venenos de las serpientes peruanas del genero *Bothrops*. *XVII RC-ICBAR UNMSM, Libro de resúmenes* (p: 64).

MEYER, K. Hyaluronidases In: Boyer, P.D. (Ed.), *The enzymes*. Academic press New York, 1971. (pp: 307-320).

MIO, K., CARRETTE, O., MAIBACH, H. I., and STERN, R. Evidence that the serum inhibitor of Hyaluronidase may be a member of the inter-alfa-inhibitor family. The journal of biological chemistry. 2000. Vol. 275, No. 42: 32413-32421.

MIO, K. and STERN, R. Inhibitors of the hyaluronidases. Matrix Biology. 2002. Vol. 21:31-37.

MOREY, SUNIL S.; KIRAM, K.M., and GADAG, J. R. Purification and properties of Hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. Toxicon 2006. Vol. 47: 188-195.

NAGARAJU, S.; DEVARAJA, S., and KEMPARAJU, K. Purification and properties of Hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. Toxicon 2007. Vol. 50: 383-393.

NOBLE, P. W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. Matrix Biol. 2002. Vol. 21:25-29.

ORTIZ C, GONZALEZ E, HUARI F, BELLIDO C, PALOMINO M, SILVA J, MENDOZA J, SEVERINO R., Y YARLEQUE A. Neutralización de algunas actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* por antivenenos de origen equino y aviar. XIX RC-ICBAR 2010 UNMSM, Libro de resúmenes (p: 119).

PAVATTAN, SIVARAMAN; SCHIRMER, TILMAN; SCHMIDT, MARGIT; AKDIS, CEZMI; VALENTA, RUDOLF; MITTERMANN, IRENE; SOLDATOVA, LYUDMILA; SLATER, JAY; MUELLER, ULRICH and MARKOVIC-HOUSLEY Z. Identification of a B-cell epitope of Hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. J. Mol. Biol. 2005. Vol. 268: 742-752.

PAWLAK, J., S. P. MACKESSY, B. G. FRY, M. BHATIA, G. MOURIER, C. FRUCHART-GAILLARD, D. SERVENT, R. MÉNEZ, E. STURA, A. MÉNEZ and R. M. KINI. 2006. Denmotoxin: A three-finger toxin from colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove catsnake) with bird-specific activity. *J. Biol. Chem.* 281:29030-29041.

PAWLAK, J., S. P. MACKESSY, N. M. SIXBERRY, E. A. STURA, M. H. LE DU, R. MÉNEZ, C. S. FOO, A. MÉNEZ, S. NIRTHANAN, and R. M. KINI. Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. *FASEB J.* 2009. October 24 [Epub ahead of print].

PESSINI, ANDREA C.; TAKAO, TANIA T.; CAVALHEIRO, ELINSAGELA C.; VICHNEWSKI, WALTER; SAMPAIO, SUELY V.; GIGLIO, JOSE R., and ARANTES, ELIANE C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 2001. 39: 1495-1504.

PRESTWICH, GLENN D.; GHALY, TAMMER.; BRUDNICKI, PHILIP.; RATLIFF, BRIAN., and GOLIGORSKY, MICHAEL S. Bioartificial stem cell niches: Engineering and Regenerative Microenviroment. *Regenerative Nephrology*, 2011:245-256.

PYRON, R. A., FRANK T. BURBRINK, GUARINO R. COLLI, ADRIAN NIETO MONTES DE OCA, LAURIE J. VITT, CAITLIN A. KUCZYNSKI and JOHN J. WIENS. The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea, with discovery of a subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59 (2011):329-342.

PUKRITTAYAKAMEE, S., WARRELL, D. A., DESAKORN, V., MCMICHAEL, A. J., WHITE, N. J., AND BUNNAG, D. The Hyaluronidase activities of some southeast asian snake venoms. *Toxicon* 1988. Vol. 26, 629-737.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatments of snake bites in South America. New York: Academic Press 1971. (84-345).

SANDOVAL G. 2010. Evaluación de la reactividad cruzada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* "Jergón" por métodos inmunoenzimáticos. Congreso científico internacional del INS. Libro de resúmenes 11.10-11.29 CCI-INS-057.

SERRANO, S. M. T., and R. C. MAROUN. 2005. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45:1115-11132.

SILVEIRA, RAFAEL B.; CHAIM, OLGA M.; MANGILI, OLDEMIR, C.; GREMSKI, WALDEMIRO; DIETRICH, CARL P.; NADER, HELENA B., and VIEGA, SILVIO S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-Acetyl-D-hexoaminidases hydrolases. *Toxicon* . 2007. Vol. 49: 758-768.

STERN, ROBERT. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003. Vol. 13: 105-115.

STERN, R. and JEDRZEJAS, M. J. The hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006. 106(3): 818-839.

STERN, R. Hyaluronidases in cancer biology. *Seminars in cancer biology* 2008. Vol. 18: 275-280.

STOCKER, K.; CHRIST, W. and LELOUP, P. Characterization of the venoms of various *Bothrops* species by immunoelectrophoresis and reaction with fibrinogen. *Toxicon*. 1974. 12: 415-417.

SZARY, S.H., KOWALCZYK-BRONISZ, and GIELDANOWSKI, J. Indomethacin as inhibitor of hyaluronidase. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 1975 (Warszawa) 23, 131–134.

REINTINGER, S; LASCHOBBER, G. T.; FEHRER, C.; GREIDERER, B., and LEPPERDINGER, G. Mouse testicular hyaluronidase-like proteins, SPAM1 and Hyal5 but not Hyalp1 degrade hyaluronan. *Biochemical Journal*. 2007. 401: 79-85.

RONCALLA, R. Efecto del ácido glutámico en venenos de serpientes de la Familias Crotalidae, Viperidae y Elapidae. Tesis para optar al Grado Académico de Bachiller en Ciencias Biológicas. 1989. UNAS. Arequipa- Perú.

TAKAHASHI, TOMOKO; IKEGAMI-KAWAI, MAYUMI; OKUDA, RYOZOU., and SUZUKI, KAORI. A fluorimetric morgan-elson assay method for Hyaluronidase activity. *Analytical biochemistry* 2003. vol. 322: 257-263.

TOOLE, B. P. 2004. Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. *Nature Rev. Cancer* 4:528-39

TU, A.T. y HENDON R.R. Characterization of lizard venom Hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp Biochem physiol B*. 1983. 76(2):377-83.

VONK, F. J., J. F. ADMIRAAL, K. JACKSON, R. RESHEF, M. A. DE BAKKER, K. VANDERSCHOOT, I. VAN DER BERGE, M. VAN ATTEN, E. BURGERHOUT, A. BECK, P. J. MIRTSCHIN, E. KOCHVA, F. WITTE, B. G. FRY, A. E. WOODS, and M. K. RICHARDSON. Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature* 2008. Vol. 454:630-633.



VOLFOVA, V., HOSTOMSKA, J., CERNY, M., VOTYPKA, J., and VOLF, P. Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on *Leishmania* infection in mice. *Neglected tropical diseases* 2008. Vol. 2(9):e294

WATSON, D. Hyaluronidase. *British journal of Anaesthesia* 1993. Vol. 71: 422-425.

WOLF, R.A., GLOGAR, D., CHAUNG, L.Y., GARRETT, P.E., ERTL, G., TUMAS, J., BRAUNWALD, E., KLONER, R.A., FELDSTEIN, M.L., and MULLER, J.E., Heparin inhibits bovine testicular hyaluronidase activity in myocardium of dogs with coronary artery occlusion. *American Journal of Cardiology*. 1984. Vol. 53, 941–944.

XU, X., X. WANG, X. XI. J. LIU, J. HUANG, and Z. LU. Purification and partial characterization of Hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon* 1982. Vol. 20:973-981.

YAMAZAKI, Y., and T. MORITA. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* 2004. Vol. 44:227-231.

YARLEQUÉ A. 2000. Las serpientes peruanas y sus venenos. Fondo Editorial, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 78 Pp.

YARLEQUE A., D. VIVAS., R. INGA., E. RODRÍGUEZ. G. A. SANDOVAL., S. PESSAH., y C. BONILLA. Acción del antiveneno botropico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2008. Vol. 25(2): 169-73.

YINGPRASERTCHAI, S., BUNYASRISAWAT, S., and RATANABANANGKOON, K. Hyaluronidase inhibitors (sodium cromoglycate and sodium auro-thiomalate) reduce the local tissue damage and prolong the survival time of mice injected with *Naja kaouthia* and *Callaselasma rhodostoma* venoms. *Toxicon* 2003. Vol. 42: 635-646.

ZAVALETA, A., y CHANG, J. Ofidismo en el Hospital General de La Merced: Estudio retrospectivo de 116 casos. Diagnóstico 1987. Vol. 20:115-20.

ZAVALETA, A. Mordedura de serpiente (Ofidismo): un problema de salud en el Perú. Rev Med Hered 2004. 15(2): 61-63

## TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Actividad específica hialuronidasa del veneno liofilizado de *B. atrox* de diferentes regiones del Perú.

Numero de muestra	Procedencia	Actividad especifica
1	Alto Marañón	12.97
2	Alto Marañón	13.09
3	Alto Marañón	13.41
4	Pucallpa	11.71
5	Tingo María	12.24
6	Junín	15.72
7	Junín	10.48
8	La Merced	12.75
9	Pucallpa	11.60
10	Pucallpa	10.43
11	Pucallpa	8.55
12	Pucallpa	10.75
Media		11.98
Desviación estándar		1.76

\*Actividad específica: Determinada por el método turbidimétrico Di Ferrante.

Tabla 2. Resumen de la purificación de hialuronidasa de *B. atrox*.

PASO	CANTIDAD PROTEINA		Actividad Especifica	UTA	Purificación	Rendimiento (%)
	mg	%				
CRUDO	100	100	8	800	1	100
DEAE A50	2	2	200	400	25	50
Sephadex G50	0.5	0.5	1157	578.5	145	72

\*Las UTA indican la actividad específica por cantidad de veneno, donde la actividad específica representa (UDF/mg).

\*1 UDF equivale a la reducción de la turbidez en 50%

Tabla 3. Estabilidad del veneno de y la hialuronidasa purificada (HA-Ba) de *B. atrox*.

Horas Muestra	0	1.5	3	24	48	96	192
<b>Veneno</b>	100%	100%	90%	90%	87%	80%	60%
<b>HA-Ba pH 5</b>	100%	100%	90%	90%	87%	80%	60%
<b>HA-Ba pH 6 c/NaCl</b>	100%	94%	85%	53%	0%	0%	0%
<b>HA-Ba pH 6 s/NaCl</b>	100%	81%	73%	44%	0%	0%	0%
<b>Glicina 10mM</b>	100%	100%	90%	84%	60%	20%	0%
<b>Glicerol 50%</b>	87%	87%	87%	40%	0%	0%	0%
<b>Control (-) Buffer</b>	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabla 4. Efecto de agentes inhibidores sobre la enzima en estudio.

<b>Agente</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Actividad (%)</b>
<b>HA-Ba</b>	-	100
<b>Suero</b>	20mg/mL	0
<b>Dexametasona</b>	4.9mM	25
<b>Dexametasona</b>	9.8mM	11
<b>EDTA</b>	2.5mM	45
<b>EDTA</b>	3.75mM	50
<b>EDTA</b>	5mM	52
<b>2-Mercaptoetanol</b>	12.7mM	98
<b>2-Mercaptoetanol</b>	6.35mM	98
<b>2-Mercaptoetanol</b>	3.15mM	98
<b>Iodoacetato</b>	2mM	75
<b>Iodoacetato</b>	3mM	71
<b>Iodoacetato</b>	4mM	67
<b>Iodoacetato</b>	5mM	63
<b>PMSF</b>	1.7mM	98
<b>PMSF</b>	3.4mM	94
<b>PMSF</b>	5.1mM	95
<b>PMSF</b>	6.8mM	92
<b>TLCK</b>	1mM	74
<b>TLCK</b>	2mM	64
<b>TLCK</b>	3mM	56
<b>TLCK</b>	4mM	45
<b>TLCK</b>	5mM	40

Tabla 5. Dosis neutralizante 50% de la actividad del veneno y HA-Ba por antivenenos de origen aviar.

Suero empleado (IgY)	Antígeno	Dosis neutralizante (uL/mg)
<b>Anti-<i>B. atrox</i></b>	Veneno de <i>B. atrox</i>	1800
<b>Anti-<i>B. atrox</i></b>	HA-Ba	7000
<b>Anti-<i>L. muta</i></b>	Veneno de <i>B. atrox</i>	400
<b>Anti-<i>L. muta</i></b>	HA-Ba	4508

\*La dosis neutralizante 50% es la cantidad de suero que reduce la actividad específica hialuronidasa en 50% por mg de muestra.

Tabla 6. Dosis neutralizante 50% de la actividad del veneno y HA-Ba por antivenenos de origen equino.

Suero empleado (IgG)	Antígeno	Dosis neutralizante (uL/mg)
<b>Anti-Botropico</b>	Veneno de <i>B. atrox</i>	192
<b>Anti-Botropico</b>	HA-Ba	2200
<b>Anti-Lachesico</b>	Veneno de <i>B. atrox</i>	80
<b>Anti-Lachesico</b>	HA-Ba	223.2

\*La dosis neutralizante 50% es la cantidad de suero que reduce la actividad específica hialuronidasa en 50% por mg de muestra.

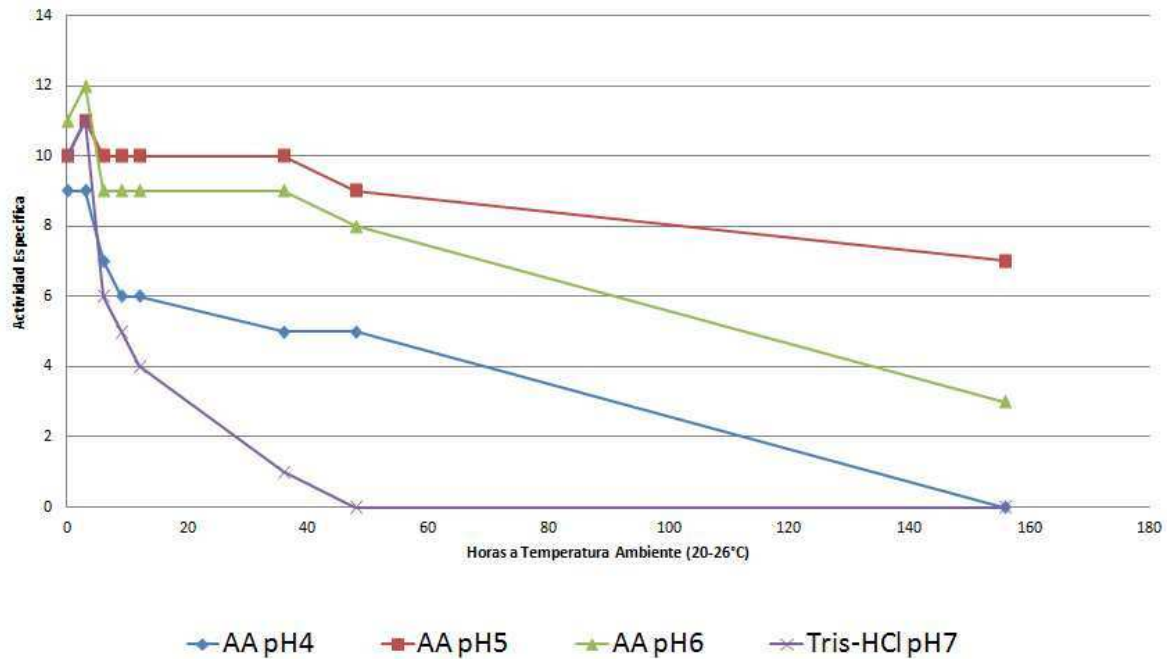


Figura 1. Actividad de hialuronidasa del veneno total de *B. atrox* en función del pH y del tiempo.

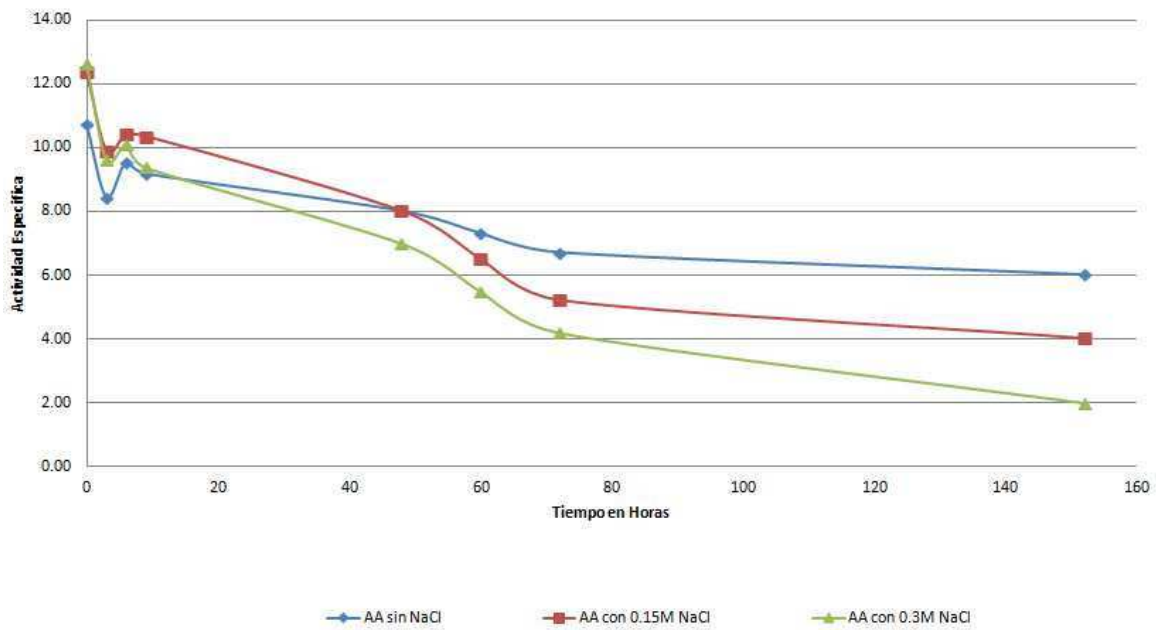


Figura 2. Actividad de hialuronidasa del veneno total de *B. atrox* en función de la concentración salina.

## Cromatograma de una DEAE Sephadex A-50

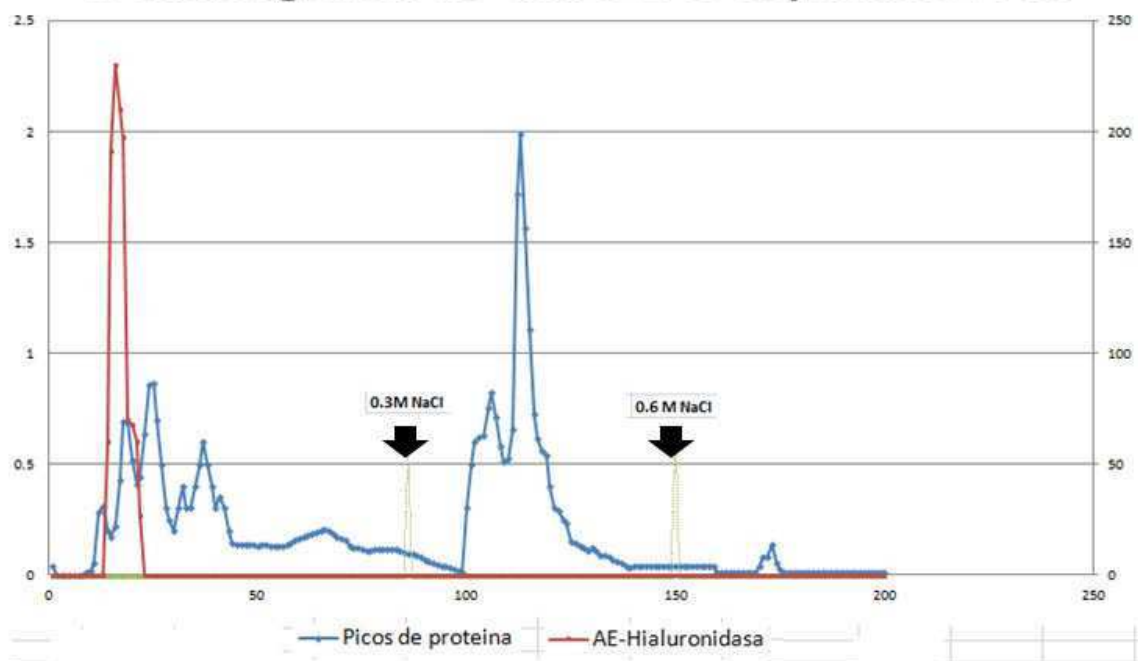


Figura 3. Purificación de HA-Ba por cromatografía de intercambio anionico en DEAE Sephadex A-50.

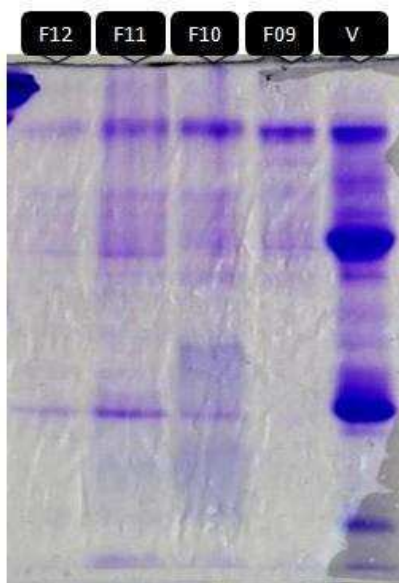


Figura 4. Análisis electroforético del veneno y de HA-Ba por PAGE-SDS luego del 1er paso de purificación.

PAGE-SDS: Acrilamida 12%



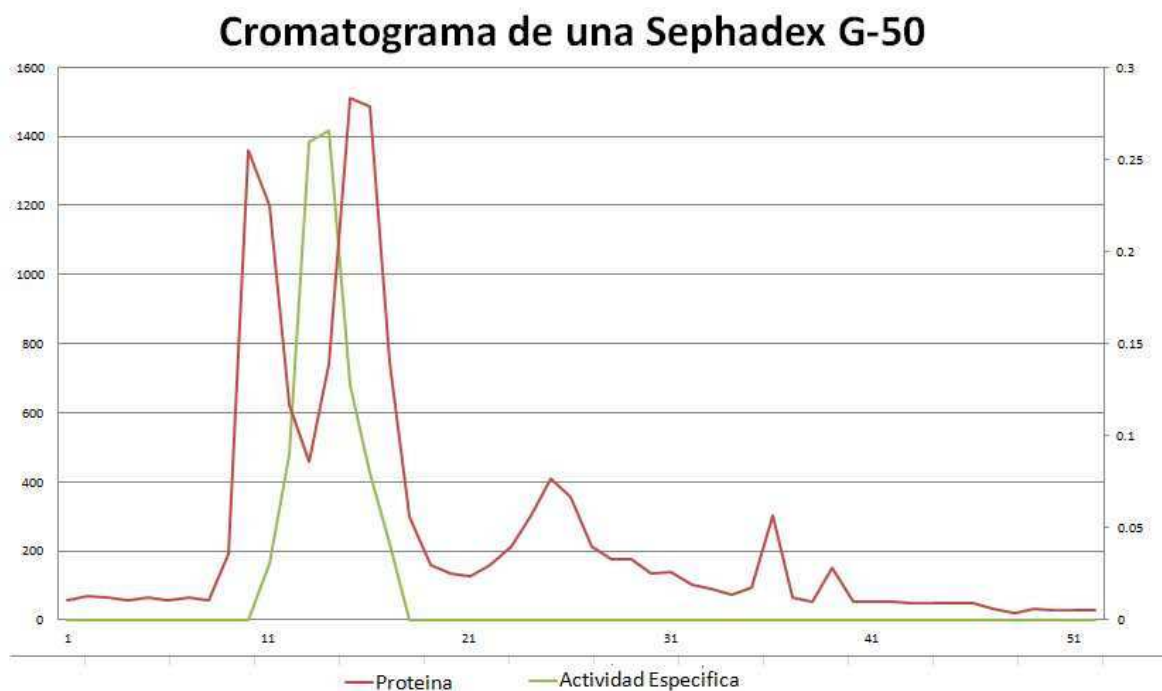


Figura 5. Cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-50.

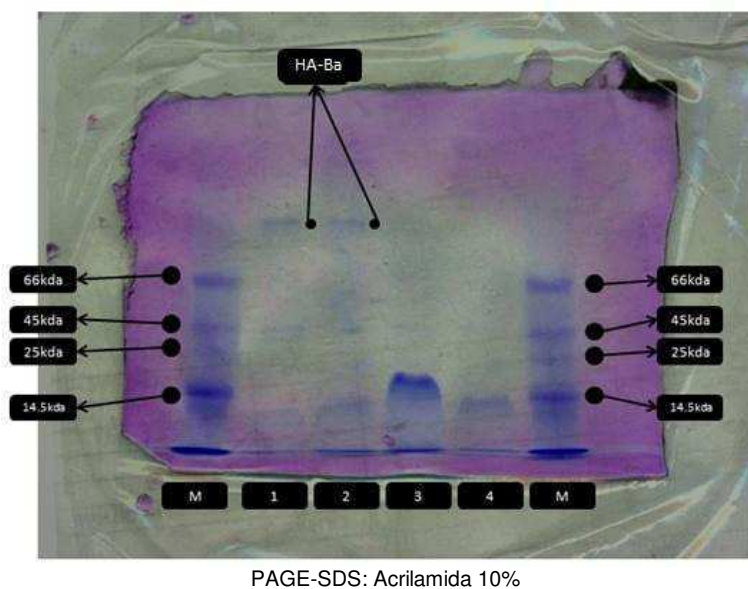
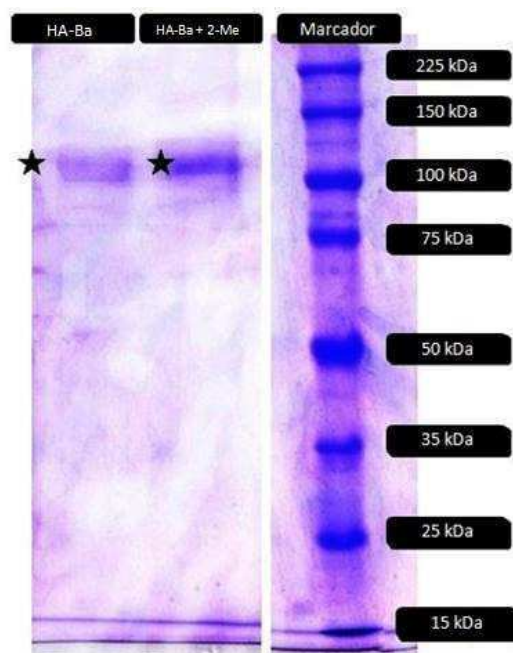
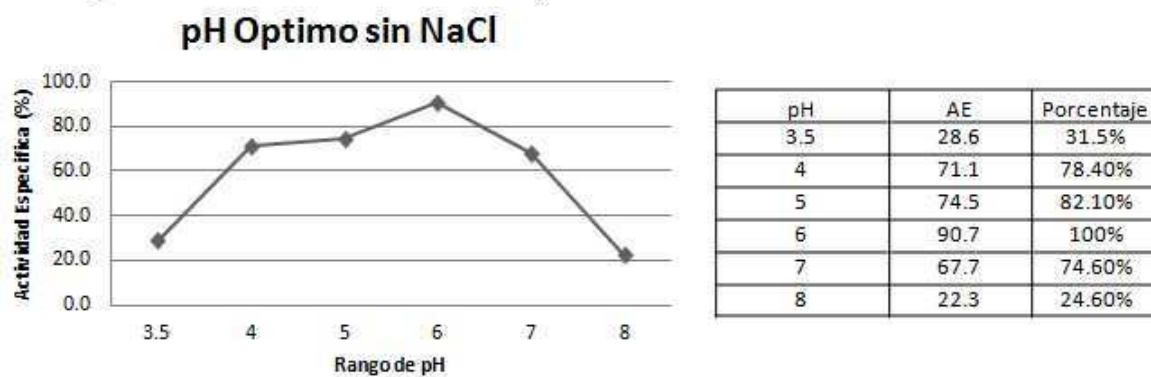


Figura 6. Análisis electroforético de HA-Ba por PAGE-SDS luego del 2er paso de purificación.



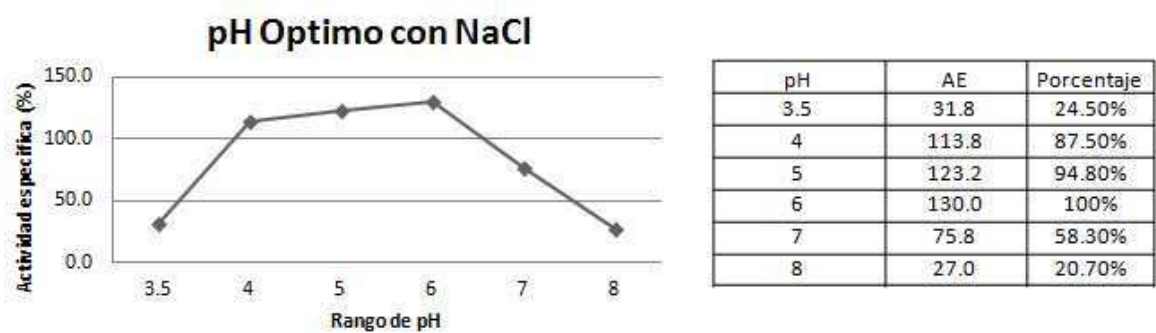
PAGE-SDS: Acrilamida 10%

Figura 7. Peso molecular de HA-Ba por PAGE-SDS en condiciones reductoras (con 2-Me) y no reductoras.



\*AE indica actividad específica

Figura 8. pH Optimo de la HA-ba en ausencia de NaCl.



\*AE indica actividad específica

Figura 9. pH Optimo de la HA-ba en presencia de NaCl 0.15M.

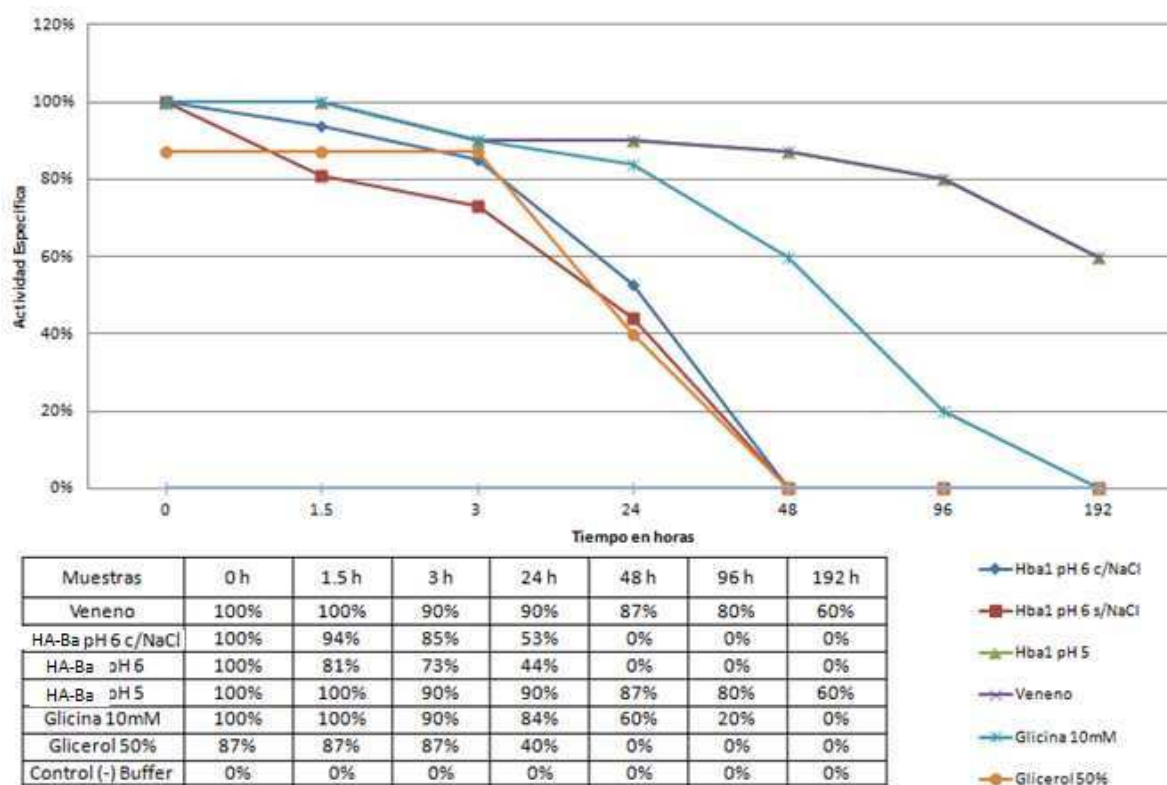


Figura 10. Efecto de agentes estabilizadores sobre la actividad HA-Ba.

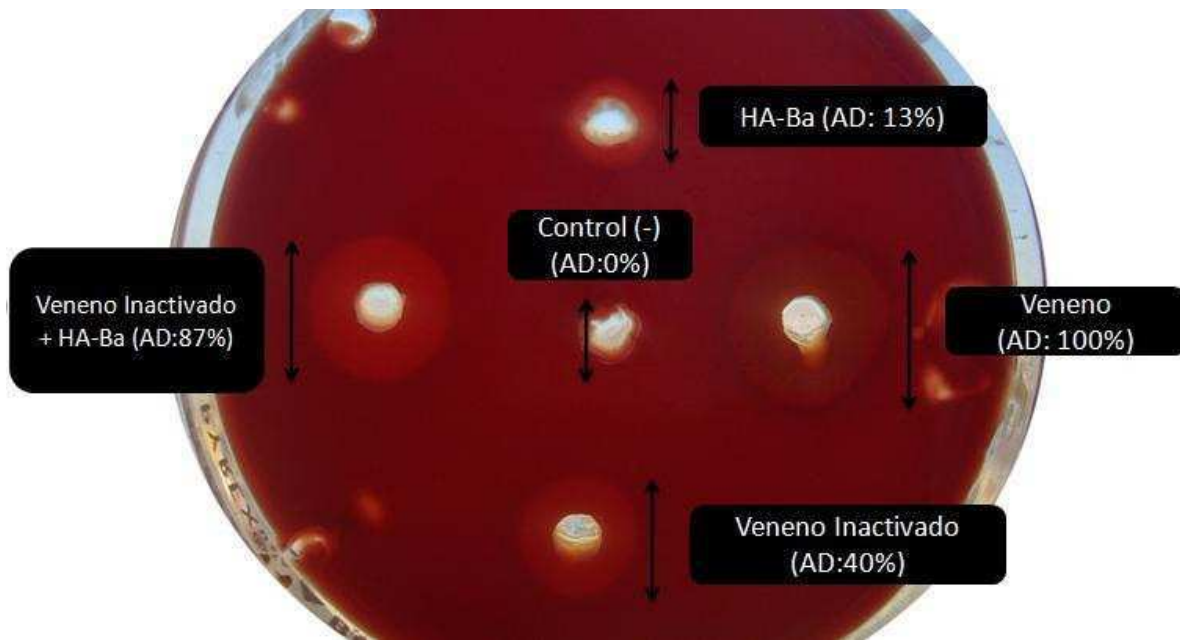


Figura 11. Actividad difusora de HA-Ba en placas de agarosa – ácido hialurónico.

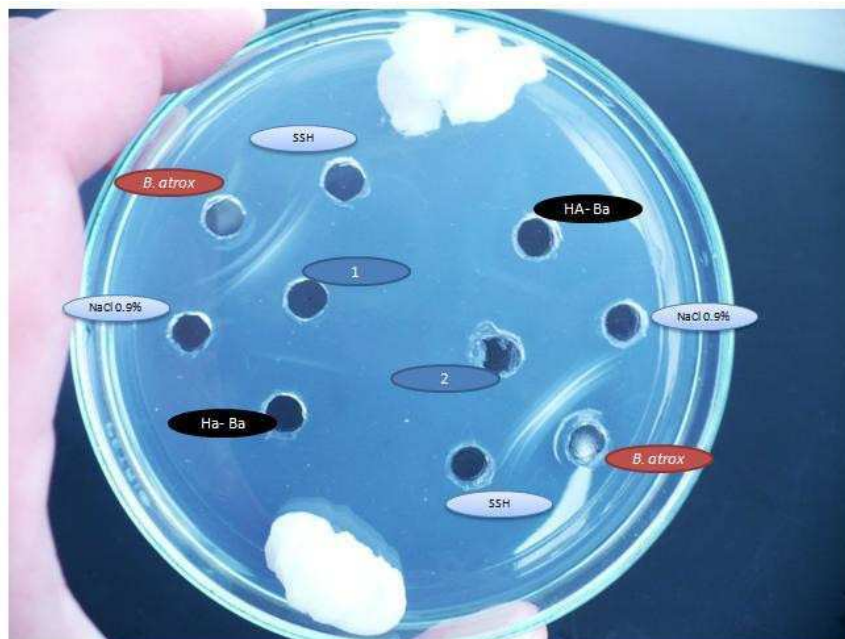


Figura 12. Reconocimiento de la antigenicidad de HA-Ba contra los antivenenos botropico y lachesico en placa de inmunodifusión.